

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 July 2001 (03.07.01)	To: Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
International application No. PCT/EP00/08808	Applicant's or agent's file reference PCT1218-066
International filing date (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)	Priority date (day/month/year) 24 September 1999 (24.09.99)
Applicant FANDKE, Markus et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 March 2001 (16.03.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Beate Giffo-Schmitt Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12Q 1/68	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/22023 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)
		(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06863
		(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)
		(30) Prioritätsdaten: 197 47 731.3 29. Oktober 1997 (29.10.97) DE
		(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MJRA DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).
		(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEISER, Matthias [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE). EPPING, Bernd [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).
		(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).
<p>(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING MICRO-ORGANISMS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method for identifying micro-organisms belonging to various taxes of micro-organisms, as specified in table 1, in a sample which can contain a plurality of various micro-organisms of said taxes, by means of nucleic acid hybridization techniques using oligo nucleotides with sequence ID. No. 1-62 as probes in order to obtain a hybridization result, whereby at least one hybridization result is obtained for each micro-organism to be identified.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verfahren zum Nachweis von in Tabelle 1 angegeben Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen dieser Taxa enthalten kann, mittels Nucleinsäurehybridisierungstechniken bei Verwendung von Oligonukleotiden mit der Seq. ID. No 1 bis 62 als Sonden, unter Erhalt eines Hybridisierungsergebnisses, wobei für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER⁶:

IPC6. C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6. C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV; JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4 January 1996 (04.01.96) cited in the application see page 41, line 30 - page 42, line 16; claims 33, 34, see page 95, see page 71, see page 1, line 1 - page 3, line 23, see page 53, line 16 - page 54, line 4; examples 2, 9, see page 91, columns 9-22	1,5,6
Y		10
X	WAGNER M ET AL; "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, (1994 MAR) 60 (3) 792-800., XP002096198 see the whole document ---	1,5,6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 2 July 1999 (02.07.99)	Date of mailing of the international search report 19 July 1999 (19.07.99)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Database Empatent, Entry E04712, Account No. E04712, 8 October 1997 (08.10.97), "Probe DNA for drug sensitivity analysis" XP002108049 see abstract & JP 1993 000 100 A (NIPPON FLOUR MILLS CO LTD) 8 January 1993 (08.01.93)</p> <p>-----</p>	1-4
A	<p>WO 93 04199 A (SCIENT GENERICS LTD) 4 March 1993 (04.03.93) see example 4</p> <p>-----</p>	1-4
A	<p>EP 0 318 245 A (ML TECHNOLOGY VENTURES) 31 May 1989 (31.05.89), see example 1</p> <p>-----</p>	1-4
P,X	<p>WO 97 41253 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH; LEISER ROBERT MATTHIAS (DE); SPERVELSLAGE JE) 6 November 1997 (06.11.97) cited in the application, see the whole documet</p> <p>-----</p>	1-13

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IBRAHIM A ET AL: "Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus <i>Acinetobacter</i> as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, (1997 Jul) 47 (3) 837-41., XP002096199 see page 840, line 53 - page 841 line 31; figure 3 see page 837 - page 839, line 5	13
Y	GUSCHIN D Y ET AL: "OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS AS GENOSENSORS FOR DETERMINATIVE AND ENVIRONMENTAL STUDIES IN MICROBIOLOGY" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, volume 63, No. 6, June 1997, pages 2397-2402, XP002064989	10
A	see the whole document	1-3,5,6,11,12
X	WO 95 24574 A (MICROPROBE CORP; BRITISCHGI THERESA B (US); CANGELOSI GERARD A (US) 21 December 1995 (21.12.95) see page 42; table 5	1-4
Y	RAINEY F A ET AL: "The phylogenetic structure of the genus <i>Acinetobacter</i> " FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, (15 December 1994) 124 (3) 349-52., XP002096200, see the whole document	1,5,6,11, 13,14
Y	ENRIGHT M C ET AL: "PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN SOME MEMBERS OF THE GENERA NEISSERIA, ACINETOBACTER, MORAXELLA, AND KINGELLA BASED ON PARTIAL 16S RIBOSOMAL DNA SEQUENCE ANALYSIS" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, volume 44, No. 3, July 1994, pages 386-391, XP000605280, see abstract; table 1	1,5,6,11, 13,14
Y	US 5 541 308 A (HOGAN JAMES J ET AL) 30 July 1996 see abstract, see column 1- column 2, line 6, see column 5, line 43 - column 8, line 6	1,5,6 11,13,14
A	EHRMANN M ET AL: "REVERSE DOT BLOT HYBRIDIZATION: A USEFUL METHOD FOR THE DIRECT IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED FOOD" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1994, pages 143-149, XP000612834, see abstract, figure 1; table 2	1-3,5,6, 11
A	BRAUN-HOWLAND E B ET AL: "USE OF A SIMPLIFIED CELL BLOT TECHNIQUE AND 16S rRNA-DIRECTED PROBES FOR IDENTIFICATION OF COMMON ENVIRONMENTAL ISOLATES" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, volume 59, No. 10, October 1993, pages 3219-3224, XP000604178 see the whole document	1-3,5, 13,14

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 1-14
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 1), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

2. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 2), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

3. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 3), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

4. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 4), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

5. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 5), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

6. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 6), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

7. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 7), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

8. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 8), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

9. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 9), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

10. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 10), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

11. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 11), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

12. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 12), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

13. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 13), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

14. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 14), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

15. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 15), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

16. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 16), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

17. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 17), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

18. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 18), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

19. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 19), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

20. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 20), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

21. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 21), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

22. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 22), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

23. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 23), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

24. . Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 24), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

25. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 25), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

26. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 26), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

27. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 27), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

28. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 28), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

29. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 29), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

30. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 30), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

31. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 31), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

32. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 32), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

33. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 33), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

34. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 34), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

35. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 35), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

36. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 36), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

37. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 37), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

38. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 38), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

39. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 39), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

40. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 40), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

41 Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 41), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

42 Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 42), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

43. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 43), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

44. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 44), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

45. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 45), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

46. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 46), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

47. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 47), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

48. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 48), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

49. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 49), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

50. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 50), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

51. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 51), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

52. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 52), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

53. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 53), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

54. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 54), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

55. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 55), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

56. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 56), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

57. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 57), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

58. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 58), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

59. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 59), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

60. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 60), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

61. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 61), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

62. Claims Nos. 1,5-10, 13 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 62), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

63. Claims Nos. 2-4 (in full); 1, 5-13 (in part)

Specific and cross-reactive, non specific 16S RNA probe combinations, as cited in table 1, identification methods using these probe combinations and substrates and kits containing these probe combinations.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9600298	A	04-01-1996	AU 2924695 A		19-01-1996
			BR 9508101 A		30-12-1997
			CA 2193101 A		04-01-1996
			CZ 9603819 A		15-04-1998
			EP 0769068 A		23-04-1997
			JP 10501976 T		24-02-1998
WO 9534574	A	21-12-1995	AU 2865495 A		05-01-1996
			EP 0804455 A		05-11-1997
			US 5712095 A		27-01-1998
			US 5770373 A		23-06-1998
			US 5726021 A		10-03-1998
US 5541308	A	30-07-1996	US 5683876 A		04-11-1997
			US 5677127 A		14-10-1997
			US 5677128 A		14-10-1997
			US 5677129 A		14-10-1997
			US 5827651 A		27-10-1998
			US 5693468 A		02-12-1997
			US 5691149 A		25-11-1997
			US 5693469 A		02-12-1997
			US 5679520 A		21-10-1997
			US 5714321 A		03-02-1998
			US 5674684 A		07-10-1997
			US 5840488 A		24-11-1998
			US 5595874 A		21-01-1997
			US 5547842 A		20-08-1996
			US 5593841 A		14-01-1997
			AT 163680 T		15-03-1998
			AU 616646 B		07-11-1991
			AU 1041988 A		16-06-1988
			CA 1339871 A		19-05-1998
			DE 3752172 D		09-04-1998
			DE 3752172 T		02-07-1998
			DK 413788 A		23-09-1988
			EP 0272009 A		22-06-1988
			ES 2112824 T		16-04-1998
			FI 883482 A		22-07-1988
			JP 10042880 A		17-02-1998
			JP 1503356 T		16-11-1989
			KR 9511719 B		09-10-1995
			PT 86204 A, B		01-12-1987
			WO 8803957 A		02-06-1988
WO 9304199	A	04-03-1993	NONE		
EP 0318245	A	31-05-1989	US 5030557 A		09-07-1991
			AT 106947 T		15-06-1994
			AU 2611288 A		14-06-1989
			CA 1319336 A		22-06-1993
			DE 3850055 D		14-07-1994
			DE 3850055 T		29-09-1994
			DK 361289 A		20-09-1989
			ES 2056115 T		01-10-1994
			FI 893526 A		21-07-1989
			JP 2502250 T		26-07-1990
			JP 2820749 B		05-11-1998
			KR 9615893 B		23-11-1996

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0318245 A		PT	89050 A, B	01-12-1988
		WO	8904876 A	01-06-1989
WO 9741253 A	06-11-1997	DE	19616750 A	06-11-1997
		AU	2888497 A	19-11-1997

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ;JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4. Januar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 41, Zeile 30 - Seite 42, Zeile 16; Ansprüche 33,34	1,5,6
Y	siehe Seite 95 siehe Seite 71 siehe Seite 1, Zeile 1 - Seite 3, Zeile 23 siehe Seite 53, Zeile 16 - Seite 54, Zeile 4; Beispiele 2,9 siehe Seite 91, Spalte 9-22	10

	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiteilhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Abeendedatum des internationalen Recherchenberichts

2. Juli 1999

19.07.99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WAGNER M ET AL: "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus <i>Acinetobacter</i> and its application for <i>in situ</i> monitoring in activated sludge." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, (1994 MAR) 60 (3) 792-800., XP002096198 siehe das ganze Dokument ---	1,5,6
X	IBRAHIM A ET AL: "Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus <i>Acinetobacter</i> as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, (1997 JUL) 47 (3) 837-41., XP002096199 siehe Seite 840, Zeile 53 - Seite 841, Zeile 31; Abbildung 3 siehe Seite 837 - Seite 839, Zeile 5 ---	13
Y	GUSCHIN D Y ET AL: "OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS AS GENOSENSORS FOR DETERMINATIVE AND ENVIRONMENTAL STUDIES IN MICROBIOLOGY" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 63, Nr. 6, Juni 1997, Seiten 2397-2402, XP002064989 siehe das ganze Dokument ---	1,5,6, 11,14
A	WO 95 34574 A (MICROPROBE CORP ;BRITISCHGI THERESA B (US); CANGELOSI GERARD A (US) 21. Dezember 1995 siehe Seite 42; Tabelle 5 ---	1-3,5,6, 11,12
X	RAINEY F A ET AL: "The phylogenetic structure of the genus <i>Acinetobacter</i> " FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, (1994 DEC 15) 124 (3) 349-53., XP002096200 siehe das ganze Dokument ---	1-4
Y	ENRIGHT M C ET AL: "PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN SOME MEMBERS OF THE GENERA NEISSERIA, ACINETOBACTER, MORAXELLA, AND KINGELLA BASED ON PARTIAL 16S RIBOSOMAL DNA SEQUENCE ANALYSIS" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Bd. 44, Nr. 3, Juli 1994, Seiten 387-391, XP000605280 siehe Zusammenfassung; Tabelle 1 ---	1,5,6, 11,13,14
		-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 541 308 A (HOGAN JAMES J ET AL) 30. Juli 1996 siehe Zusammenfassung siehe Spalte 1 - Spalte 2, Zeile 6 siehe Spalte 5, Zeile 43 - Spalte 8, Zeile 6 ---	1,5,6, 11,13,14
A	EHRMANN M ET AL: "REVERSE DOT BLOT HYBRIDIZATION: A USEFUL METHOD FOR THE DIRECT IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED FOOD" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1994, Seiten 143-149, XP000612834 siehe Zusammenfassung; Abbildung 1; Tabelle 2 ---	1-3,5,6, 11
A	BRAUN-HOWLAND E B ET AL: "USE OF A SIMPLIFIED CELL BLOT TECHNIQUE AND 16S rRNA-DIRECTED PROBES FOR IDENTIFICATION OF COMMON ENVIRONMENTAL ISOLATES" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 59, Nr. 10, Oktober 1993, Seiten 3219-3224, XP000604178 siehe das ganze Dokument ---	1-3,5, 13,14
A	Database Empatent Entry E04712 Acc. Nr. E04712, 08-10-1997 "Probe DNA for drug sensitivity analysis" XP002108049 siehe Zusammenfassung & JP 1993 000 100 A (NIPPON FLOUR MILLS CO LTD) 8. Januar 1993 ---	1-4
A	WO 93 04199 A (SCIENT GENERICS LTD) 4. März 1993 siehe Beispiel 4 ---	1-4
A	EP 0 318 245 A (ML TECHNOLOGY VENTURES) 31. Mai 1989 siehe Beispiel 1 ---	1-4
P,X	WO 97 41253 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH ;LEISER ROBERT MATTHIAS (DE); SPERVERSLAGE JE) 6. November 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-13

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
1-14

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 1), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

2. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 2), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

3. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 3), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

4. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 4), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

5. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 5), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

6. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 6), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

7. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 7), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

8. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 8), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

9. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 9), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

10. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 10), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

11. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 11), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

12. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 12), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

13. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 13), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

14. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 14), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

15. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 15), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

16. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 16), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

17. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 17), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

18. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 18), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

19. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 19), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

20. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 20), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

21. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 21), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

22. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 22), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

23. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 23), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

24. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 24), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

25. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 25), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

26. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 26), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

27. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 27), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

28. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 28), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

29. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 29), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

30. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 30), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

31. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 31), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

32. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 32), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

33. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 33), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

34. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 34), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

35. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 35), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

36. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 36), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

37. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 37), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

38. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 38), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

39. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 39), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

40. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 40), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

41. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 41), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

42. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 42), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

43. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 43), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

44. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 44), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

45. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 45), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

46. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 46), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

47. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 47), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

dieses Oligonukleotid beinhalten.

48. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 48), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

49. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 49), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

50. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 50), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

51. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 51), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

52. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 52), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

53. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 53), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

54. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 54), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

55. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 55), Nachweisverfahren die

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

56. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 56), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

57. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 57), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

58. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 58), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

59. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 59), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

60. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 60), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

61. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 61), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

62. Ansprüche: 1, 5-10, 13 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 62), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

63. Ansprüche: 2-4 (komplett), 1,5-13 (teilweise)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

In Tabelle 1 angegebene Kombinationen von spezifischen mit kreuzreaktiven, unspezifischen 16S-RNA Sonden, Nachweisverfahren die diese Sondenkombinationen benutzen und Substrate und Kits die diese Sondenkombinationen beinhalten.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06863

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9600298 A	04-01-1996	AU 2924695 A BR 9508101 A CA 2193101 A CZ 9603819 A EP 0769068 A JP 10501976 T	19-01-1996 30-12-1997 04-01-1996 15-04-1998 23-04-1997 24-02-1998
WO 9534574 A	21-12-1995	AU 2865495 A EP 0804455 A US 5712095 A US 5770373 A US 5726021 A	05-01-1996 05-11-1997 27-01-1998 23-06-1998 10-03-1998
US 5541308 A	30-07-1996	US 5683876 A US 5677127 A US 5677128 A US 5677129 A US 5827651 A US 5693468 A US 5691149 A US 5693469 A US 5679520 A US 5714321 A US 5674684 A US 5840488 A US 5595874 A US 5547842 A US 5593841 A AT 163680 T AU 616646 B AU 1041988 A CA 1339871 A DE 3752172 D DE 3752172 T DK 413788 A EP 0272009 A ES 2112824 T FI 883482 A JP 10042880 A JP 1503356 T KR 9511719 B PT 86204 A,B WO 8803957 A	04-11-1997 14-10-1997 14-10-1997 14-10-1997 27-10-1998 02-12-1997 25-11-1997 02-12-1997 21-10-1997 03-02-1998 07-10-1997 24-11-1998 21-01-1997 20-08-1996 14-01-1997 15-03-1998 07-11-1991 16-06-1988 19-05-1998 09-04-1998 02-07-1998 23-09-1988 22-06-1988 16-04-1998 22-07-1988 17-02-1998 16-11-1989 09-10-1995 01-12-1987 02-06-1988
WO 9304199 A	04-03-1993		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/06863

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0318245 A	31-05-1989	US	5030557 A	09-07-1991
		AT	106947 T	15-06-1994
		AU	2611288 A	14-06-1989
		CA	1319336 A	22-06-1993
		DE	3850055 D	14-07-1994
		DE	3850055 T	29-09-1994
		DK	361289 A	20-09-1989
		ES	2056115 T	01-10-1994
		FI	893526 A	21-07-1989
		JP	2502250 T	26-07-1990
		JP	2820749 B	05-11-1998
		KR	9615893 B	23-11-1996
EP 0318245 A		PT	89050 A,B	01-12-1988
		WO	8904876 A	01-06-1989
WO 9741253 A	06-11-1997	DE	19616750 A	06-11-1997
		AU	2888497 A	19-11-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08808

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7: C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7: C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 484 909 A (NIETUPSKI RAYMOND M ET AL) 16 January 1996 (16.01.96) in the cited application Claims 1-11; Example 3	1-8
X	SATOKARI REETTA ET AL: "Detection of beer spoilage bacteria Megasphaera and Pectinatus by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, Vol. 45, Nr. 2, 08 December 1998 (08.12.98), Pages 119-127. XP001002138 ISSN: 0168-1605 the whole document	1-8

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"&" document member of the same patent family

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

Date of the actual completion of the international search
18 May 2001 (18.05.01)

Date of mailing of the international search report
26 September 2001 (26.09.01)

Name and mailing address of the ISA

Authorized officer

European Patent Office

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/08808

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 196 16 750 A (NEWLAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH) 06 November 1997 (06.11.97) Page 2, Line 24 –Page 3, Line 49; Claims 1-12; Examples 1-4	1-8
X	WO 99 22023 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH; EPPING BERND (DE); LEISER MATTHIAS (DE)) 06 May 1999 (06.05.99) Page 5, last paragraph; Claim 1; Table 1	1-8
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Vol. 017, no. 278 (C-1065) 28 May 1993 (28.05.93) & JP 05 015400 A (SAPPORO BREWERIES LTD), 26 January 1993 (26.01.93) Abstract	1, 8-16, 19, 20, 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/08808

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-16, 18-20 (in part) 26 (in full)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/08808

The International Searching Authority found that this International Application contains several inventions or groups of inventions, as follows:

1. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 26 (in full)

Invention 1:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 1, 21, 73, 74, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of *Lactobacillus brevis* that is specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

2. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 27 (in full)

Invention 2:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 2, 22, 75, 76, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of *Lactobacillus lindneri* that is specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

3. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 28, 29 (in full)

Invention 3:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 3-5, 23, 77-81, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of *Lactobacillus casei* or *paracasei* that are specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

4. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 30, 31 (in full)

Invention 4:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 6, 7, 24, 82, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of *Lactobacillus coryniformis* that is specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

5. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 32 (in full)

Invention 5:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 8, 25, 83, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/08808

Lactobacillus curvatus that is specific to the brewing process. Applications. methods and kits that use or contain said nucleic acids.

6. Claims nos: 1-17, 19, 20 (in part)

Invention 6:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 98-103, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of all Lactobacillaceae that are specific to the brewing process. Applications. methods and kits that use or contain said nucleic acids.

7. Claims nos: 1-20 (in part) 21, 33, 34 (in full)

Invention 7:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 9-10, 26, 27, 35, 84-86, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of bacteria of the genus Pediococcus that are specific to the brewing process. Applications. methods and kits that use or contain said nucleic acids.

8. Claims nos: 1-20 (in part), 22, 35-37 (in full)

Invention 8:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 11, 14, 28-30, 36, 87-93, 104, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of bacteria of the genus Pectinatus that are specific to the brewing process. Applications. methods and kits that use or contain said nucleic acids.

9. Claims nos: 1-20 (in part), 23, 38 (in full)

Invention 9:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 15, 16, 31, 37, 40-72, 97, 107, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of bacteria of the genus Megasphaera that are specific to the brewing process. Applications. methods and kits that use or contain said nucleic acids.

10. Claims nos: 1-20 (in part), 24, 39 (in full)

Invention 10:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 17, 18, 32, 38, 94, 105, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of bacteria of the genus Selenomonas that are specific to the brewing process. Applications. methods and kits that use or contain said nucleic acids.

11. Claims nos: 1-20 (in part), 25, 40-41 (in full)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08808

Invention 11:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 19, 20, 33, 34, 39, 40-72, 95, 96, 106, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of bacteria of the genus Zymophilus that are specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

12. Claims nos: 1-16, 19, 20 (in part)

Invention 12:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 40-47, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of all bacteria that are specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

13. Claims nos: 1-16, 19, 20 (in part)

Invention 13:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 48-54, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of all bacteria that are specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

14. Claims nos: 1-16, 19, 20 (in part)

Invention 14:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 55-59, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of all bacteria that are specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

15. Claims nos: 1-16, 19, 20 (in part)

Invention 15:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 60-72, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of all bacteria that are specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/08808

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5484909 A	16-01-1996	EP 0674650 A		04-10-1995
		JP 8503620 T		23-04-1996
		WO 9507289 A		16-03-1995
		US 5705339 A		06-01-1998
DE 19616750 A	06-11-1997	AU 2888497 A		19-11-1997
		WO 9741253 A		06-11-1997
WO 9922023 A	06-05-1999	AU 1337099 A		17-05-1999
JP 05015400 A	26-01-1993	JP 3067850 B		24-07-2000

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/22023 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)
		(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06863
(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)		
(30) Prioritätsdaten: 197 47 731.3 29. Oktober 1997 (29.10.97) DE		
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): MIRA DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).		
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LEISER, Matthias [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE). EP-PING, Bernd [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).		
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		
<p>(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING MICRO-ORGANISMS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method for identifying micro-organisms belonging to various taxa of micro-organisms, as specified in table 1, in a sample which can contain a plurality of various micro-organisms of said taxa, by means of nucleic acid hybridization techniques using oligo nucleotides with sequence ID. No. 1-62 as probes in order to obtain a hybridization result, whereby at least one hybridization result is obtained for each micro-organism to be identified.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verfahren zum Nachweis von in Tabelle 1 angegeben Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen dieser Taxa enthalten kann, mittels Nucleinsäurehybridisierungstechniken bei Verwendung von Oligonukleotiden mit der Seq. ID. No 1 bis 62 als Sonden, unter Erhalt eines Hybridisierungsergebnisses, wobei für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird.</p>		
<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), curisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalem Recherchebericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Leitland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthalten kann.

Die Identifikation von Mikroorganismen aus komplexen Proben (die mehrere unterschiedliche Keime im Gemisch enthalten) ist eine wichtige und schwierige Aufgabe, zum Beispiel bei Hygieneuntersuchungen und anderen Vorhaben.

Die WO-A-97/41253 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von einem Mikroorganismus oder mehreren Mikroorganismen in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthält, mittels molekularbiologischer Techniken, wie Amplifikationsreaktionen, wobei mindestens eine Hybridisierungssonde (A), die konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist und mindestens eine Hybridisierungssonde (B), die weniger konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist, zu der Probe gegeben werden, mit der Maßgabe, daß pro interessierendem Mikroorganismus mindestens eine Hybridisierungssonde des Typs (A) und des Typs (B) vorhanden sein muß, sich die Probe in einem hybridisierungsfähigen Zustand befindet und durch ein entstehendes Hybridisierungsmuster eine Identifikation des oder der interessierenden Mikroorganismen erfolgt.

Nachteilig an der geschilderten Methode ist, daß viele Bakterienarten aufgrund zu geringer Sequenzvariationen im Bereich der ribosomalen Gene, speziell der 16S rDNA, häufig Kreuzreaktionen mit den gewählten Oligonucleotid-Sequenzen zeigen und demzufolge nicht voneinander differenziert werden können.

WO-A-96/00298 betrifft ein Verfahren zur simultanen Detektion und Identifikation und Differentiation von Eu-Bakterien unter Verwendung eines Hybridisationassays. Dabei werden im wesentlichen 16S-23S rRNA Spacerbereiche amplifiziert und die erhaltenen Nucleinsäuren mit Sonden spezifischer Art hybridisiert. Der Nachteil dieser Methode beruht darin, daß der 16S-23S-Spacerbereich bei vielen Mikroorganismen kein funktioneller Abschnitt ist und deswegen keinem oder nur einem sehr geringen Selektionsdruck unterliegt. Als Folge lassen sich selbst innerhalb einer Art in den verschiedenen rDNA-Operonen Unterschiede in den Längen und Sequenzen der Spacersbereiche nachweisen, die häufig keinen Bezug zu phylogenetischen Zusammenhängen erkennen lassen (T. Hain: Molekulare Identifizierung von Streptomyzeten über Sequenzanalyse der Spacersbereiche ribosomaler RNA-Operone; Diplomarbeit Naturwiss. Fak. Der TU Carolo Wilhemina Braunschweig, 1995, 63 S.) und deshalb für diagnostische Fragestellungen ungeeignet erscheinen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß die Spacerssequenzen bisher nur bei wenigen Arten untersucht sind und es demzufolge für sie im Unterschied zu den 16S rDNA-Sequenzen noch keine ausreichenden Sequenzdatenbanken gibt. Dies bedeutet, daß bislang nicht genügend Sequenzinformationen vorliegen, um Nachweismethoden auf der Basis der Spacersregionen für die wichtigsten Bakterienarten zu entwickeln, selbst wenn der erstgenannte Nachteil beherrschbar wäre.

EP-A-0 497 464 A1 betrifft einen mikrobiologischen Schnellassay durch *in situ* Hybridisation in wäßriger Lösung. Dabei werden die Mikroorganismen zunächst mit

einer wäßrigen Zusammensetzung in Kontakt gebracht, wodurch die Mikroorganismen zum einen fixiert und zum anderen die Zellwände für Oligonucleotide durchlässig gemacht werden. Danach werden markierte Nucleinsäuresonden zugegeben, die mit bestimmten Nucleotidsequenzen in der zellulären Nucleinsäure komplementär sind, so daß sich eine Hybridisierungsreaktion einstellt, gefolgt von einer Detektion der hybridisierten Nucleinsäure. Dieses Verfahren betrifft eine In-situ-Hybridisierungsmethode. Die Erkenntnisse und Methoden sind auf in-vitro-Analysen, wie sie bei PCR- und Hybridisierungstests in Reaktionsgefäß en mit isolierter Ziel-Nucleinsäure üblich sind, nicht übertragbar. In-situ-Methoden haben den Nachteil, daß Probenvorbereitung und/oder Testdurchführung, insbesondere was den Detektionsteil betrifft, sehr komplizierte und teure Geräte erfordert.

US-A-5,614,361 betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung eines unbekannten Organismus in einer Probe durch Bestimmung der Position eines Teils oder der gesamten konservierten DNA des betreffenden Organismus relativ zur Position von Restriktionsendonuclease-Spaltungsstellen in der DNA, wobei sich ein für einen bestimmten Mikroorganismus charakteristisches Muster einstellt. Nachteilig an diesem Verfahren ist, daß die Identifizierung von Organismen anhand ihrer DNA-Spaltmuster nach Abbau durch Restriktionsendonucleasen sehr aufwendig ist und die Reinkultur der zu analysierenden Organismen verlangt.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht mithin darin, zunächst die genannten Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und darüber hinaus auch dem Anwender ein Verfahren an die Hand zu geben, daß es ihm nach Maßgabe seiner analytischen Probleme erlaubt, ein Assay-Verfahren zusammenzustellen, daß auf die spezifischen Bedürfnisse eines Analysenproblems zugeschnitten ist.

Gelöst wird dieses Problem durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Überraschenderweise gewährleisten die erfindungsgemäßen Oligonucleotide mit den Seq. ID. Nr. 1 - 62 gemäß Sequenzprotokoll eine praxisgerechte Bakterienidentifikation.

Die variablen Regionen ribosomaler Gensequenzen sind häufig benutzt worden, um phylogenetische Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen Arten herzustellen und DNA-Sonden bzw. PCR-Startoligonucleotide für diagnostische oder analytische Zwecke zu entwerfen und zu verwenden.

Allerdings hat sich hierbei mittlerweile in der Fachwelt die Anschauung durchgesetzt, daß die Sequenzen insbesondere der kleinen ribosomalen RNA (16S rDNA von Prokaryonten) wenig geeignet sind, um enger verwandte Bakterienarten geschweige denn -stämme hinreichend voneinander unterscheiden zu können. So schreiben z. B. Barry et al. (The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria, PCR Methods and Applications 1(1991) 51 - 56), daß zu wenig Sequenzvariationen zwischen den 16S rRNA-Genen von eng verwandten Mikroorganismen beobachtet werden. Cilia et al. (Sequence heterogeneties among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level, Molec. Biol. Evol. 13(1996) 451 - 461) stellen fest, daß rRNA-Sequenzen der kleinen Untereinheit nicht adäquat geeignet sind, um phylogenetische Beziehungen zwischen eng verwandten Arten, geschweige denn verschiedenen Stämmen innerhalb einer Art zu analysieren. Sie zitieren hierzu weitere Autoren (Ash et al., Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences, Lett. Appl. Microbiol. 13(1991) 202 - 206; Rössler et al., 1991; Ruimy et al., 1994). Ähnlich äußern sich Berthier und

Ehrlich (Rapid species identification with two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. Fems Microbiol. Letters 161 (1998) 97 - 106). rRNA-Sonden eng verwandter Arten können aufgrund der hohen Ähnlichkeit der rRNA-Sequenzen nicht verwendet werden. Sie zitieren hierzu weiterhin Fox et al. (How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identify, Int. J. Bacteriol. 42 (1992) 166 - 170), Schleifer et al. (Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria, Int. Dairy J. 5 (1995) 1081 - 1094) und Cerk et al. (*Lactobacillus paraplantarum* sp. Nov., A new species related to *Lactobacillus plantarum*, Int. J. Syst. Bacteriol. 46 (1996) 595 - 598.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt auch eine simultane Erfassung und simultanen Nachweis von Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthalten kann. Unter dem Begriff "Taxon" werden Familien, Gattungen, Arten und Unterarten von Mikroorganismen verstanden.

Basis für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Anwendung von Nucleinsäurehybridisierungstechniken. Dabei werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die mit DNA oder RNA, die indikativ für Mikroorganismen sind und aus den nachzuweisenden Organismen stammen, in Wechselwirkung treten. Ist die Konzentration an nachzuweisender Nucleinsäure zu gering, können gegebenenfalls Amplifikationstechniken zur Erhöhung der Konzentration eingesetzt werden. Durch Hybridisierung der Sonden mit der DNA oder RNA wird ein Hybridisierungsergebnis erhalten. Erfindungsgemäß ist dabei wesentlich, daß für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus zunächst mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird. Dies kann insbesondere durch das in der WO-A-97/41253 beschriebene Verfahren

erfolgen. Auf den Gegenstand der WO-A-97/41253 wird ausdrücklich Bezug genommen.

Als Sonden werden erfindungsgemäß Oligonucleotide eingesetzt, die einer der im Sequenzprotokoll mit den Seq. Id. Nr. 1 - 62 ausgewiesenen Sequenzen besitzt. Dabei kann erfindungsgemäß sowohl das gesamte Ensemble der Oligonucleotide mit den Nr. 1 - 62 eingesetzt werden oder aber der Anwender sucht die zu seinem Nachweisproblem zugehörigen Oligonucleotide mit der Maßgabe der Zuordnung gemäß Tabelle 1 aus. Erfindungswesentlich ist, daß die Tabelle 1 angibt, welche der genannten Oligonucleotidsequenzen indikativ für das betreffende Taxon ist.

Tabelle 1: Experimentelle Untersuchungen artifizieller Gemische

Diagnostische Fragestellung: Familien-, Gattungs-, Gruppenebene	Oligo- nucleotid 1	Oligo- nucleotid 2	Oligo- nucleotid 3	Oligo- nucleotid4
Acinetobacter spp. ¹⁾	Ac.an1r	P		
Acinetobacter spp. ²⁾	Ac.xx1r	P		
Aeromonas spp. ³⁾	Ae.calr	P		
Alcaligenes spp. ⁴⁾	Al.xx1r	P	Al.xx2r	P
Campylobacter spp. ⁵⁾	Ca.jelr	P		
Listeria spp.	Li.mo2r	P	Ba.la.gr1r	P
Enterobakterien ⁶⁾	Gammalr			
Diagnostische Fragestellung: Artenebene	Oligo- nucleotid 1	Oligo- nucleotid 2	Oligo- nucleotid 3	Oligo- nucleotid4
Acinetobacter junii	Ac.calr	P	En.aelr	P
Aeromonas hydrophilia	Ae.hy1r	P	Ae.hy2r	P
Aeromonas salmonicida	Ae.salr	P	Ed.talr	P
Aeromonas schubertii	Ae.sclr	P	Pr.vu3r	P
Alcaligenes faecalis	Al.fa2r	P		
Bacillus cereus	Ba.ce.gr1r	P	Ba.ce.gr2r	P
				I
Bacillus subtilis	Ba.su2r	P		
Brochothrix thermosphacta	Br.th3r	P	Br.th2r	P

<i>Carnobacterium divergens</i>	Ca.dilr	P						
<i>Carnobacterium galinarum</i>	Ca.pi/galr	P						
<i>Carnobacterium piscicola</i>	Ca.pi/galr	P						
<i>Citrobacter freundii</i>	Ci.fr2r	P	Ci.fr3r	P	Ci.fr5r	P	Sa.ty2r	P
<i>Clostridium perfringens</i>	Cl.pelr	P						
<i>Edwardsiella tarda</i>	Ed.talr	P	Gammalr	P				
<i>Enterobacter aerogenes</i>	En.aelr	P	Gammalr	P				
<i>Enterobacter cloacae</i>	En.cl3r	P	Sa.ty2r	P	Gammalr	P		
<i>Escherichia coli/S. spp.</i>	Es.co2r	P	Es.co3r	P	Gammalr	P		
<i>Flavobacterium breve</i>	Fl.br2r	P	En.cl3r	P	Fl.brlr	P		
<i>Flavobacterium odoratum</i>	Fl.od1r	P						
<i>Hafnia alvei</i>	Ha.al2r	P						
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kl.ox3r	P	Gamma1	P				
<i>Lactobacillus paracasei</i>	La.palr	P	La.pa2r	P				
<i>Microbacterium lacticum</i>	Mi.la2r	P	Mi.xx1r	P				
<i>Moraxella bovis</i>	Mo.bolr	P	Mo.ca2r	P				
<i>Pediococcus damnosus</i>	Pe.da/palr	P						
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Pl.sh1r	P						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ps.aelr	P						
<i>Ralstonia pickettii</i>	Ra.pilr	P	Ra.pi2r	P				
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Sa.ty2r	P	Sa.xx5r	P				
<i>Serratia marcescens</i>	Se.malr	P						
<i>Staphylococcus aureus</i>	St.au2r pre	P	St.au/halr	P	Ba.ce/Stpl r	P		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Str.ag1r	P	Br.th2r	P				
<i>Vibrio vulnificus</i>	Vi.vulr	P	Vi.vu2r	P				
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ye.en1r	P	Gammalr	P				

1) *Acinetobacter anitra* (DSM 30008), *Acinetobacter baumannii* (DSM 30007),
Acinetobacter haemolyticus

2) *Acinetobacter baumannii* (DSM 30007), *Acinetobacter baumannii* (DSM 1139),
Acinetobacter calcoaceticus (DSM 30006), *Acinetobacter haemolyticus*

3) *Aeromonas caviae*, *Aeromonas enteropelogenes*

4) *Alcaligenes denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*

5) *Campylobacter* Spezies

6) *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli/S.spp.*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica*

P bedeutet "positiv"

Die Tabelle 2 stellt die Konkordanz zwischen den Oligonucleotiden und deren Bezeichnung gemäß Tabelle 1 her.

Als Starteroligonucleotid wurde 10-30f mit der Sequenz
GAG TTT GAT CCT GGC TCA G verwendet (Seq. Id. Nr. 62).

Tabelle 2

ID-Nr.	Abkürzung	Sequenz 5'-3'
1.	Ac.an1r	CAC TAT CTC TAG GTA TTA ACT AAA GT
2.	Ac.calr	AGG TAT TAA CTT CAG TAG CC
3.	Ac.xx1r	CGA GTA ACG TCC ACT ATC TG
4.	Ae.calr	CCA GCA GAT ATT AGC TAC TG
5.	Ae.hy 1r	TTG ATA CGT ATT AGG CAT CA
6.	Ae.hy 2r	GTT GAT ACG TAT TAG GCA TCA
7.	Ae.salr	TTG ACA CGT ATT AGG CGC
8.	Ae.sclr	TGG CAG GTA TTA ACC ACC A
9.	Al.fa2r	TCT CGT ATT AGG AGA TAC CTT
10.	Al.xx1r	TAC TGG GCA CGT TCC GAT AT
11.	Al.xx2r	ATA TCG GCC GCT CCA ATA GT
12.	Ba.ce gr2r	TAC CGT CAA GGT GCC AGC T
13.	Ba.ce/stp1r	CCA TGC GGT TCA AAA TGT T
14.	Ba.ce gr1r	CCA GCT TAT TCA ACT AGC
15.	Ba.la gr1r	CGG AAA CCC TCC AAC A
16.	Ba.su2r	ACC GCC CTA TTC GAA CGG T
17.	Br.th2r	AGC GCG GGT CCA TCT CAC
18.	Br.th3r	CAT CTT ATG ATG TTC AGC ACA
19.	Ca.dilr	CC ATG CGG TCA CTT GAA AT
20.	Ca.je1r	AG TGT CAT CCT CCA
21.	Ca.je2r	ATT CTT CCC TAA GAA AAG GAG
22.	Ca.je3r	CGT CAG AAT TCT TCC CTA AG
23.	Ca.pi/galr	TCA TGC GAT TCC TGA AAC
24.	Ci.fr2r	GT AAC GTC AAT GGC TGA GGT
25.	Ci.fr3r	TT CTC TGG ATG TCA AGA GT
26.	Ci.fr5r	CC AAG GCA TCT CTG CCA AG
27.	Cl.pe1r	CC TTT GGT TGA ATG ATG
28.	Ed.ta1r	CC CGT ATC TCT ACA GGA
29.	En.ae2r	GAG TAA CGT CAA TCG CCA AG

ID-Nr.	Abkürzung	Sequenz 5'-3'
30.	En.cl3r	AG CCG TTA CCC CAC CTA CT
31.	Es.co2r	GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC
32.	Es.co3r	GTA ACG TCA ATG AGC AAA GG
33.	Fl.br1r	TA CGC ATG CCT ATC CTA CT
34.	Fl.br2r	TG GTA CCT TCA GCT ACT TA
35.	Fl.od1r	CCA TGG AGC ATT AAT CCG AA
36.	Gamma 1	AAG GTC CCC CTC TTT GGT
37.	Ha.al2r	GT AAC GTC AAT CAC TGT GG
38.	Kl.ox3r	GGT AAC GTC AAT GAA TAA GGT
39.	La.pa1r	CAA CAG TTA CTC TGC CGA CCA
40.	La.pa2r	TTA CGC CAT CTT TCA GCC A
41.	Li.mo2 r	CAA GCA GTT ACT CTT AT
42.	Mi.la2r	AT TTC TGG CCC GTT CTC GT
43.	Mi.xx1r	ATT TCT GGC CCG TTC TCG
44.	Mo.bolr	CTA TCT CTA GCG AAT TCT TGG
45.	Mo.ca2r	GGT AAC GTC AGG GCT TAT G
46.	Pe.da/pa1r	TGG ATA CCG TCA CTG CAT GAG
47.	Pl.sh1r	CCA CTA GGT ATT AAC TAG TGA
48.	Pr.vu3r	AAC CCC TGC TTT GGT CCG TA
49.	Ps.ae1r	CCG TAC TCT AGC TCA GT
50.	Ra.pi1r	GGT ATT AAC CAG AGC CAT
51.	Ra.pi2r	TAG CCG TGC AGT CAC CA
52.	Sa.ty2 r	CTG CGG TTA TTA ACC ACA ACA
53.	Sa.xx5r	ACC AAT CCA TCT CTG GAT TC
54.	Se.malr	ATG AGC GTA TTA AGC TCA CCA
55.	St.au/halr	GGC TCT ATC TCT AGA GTT G
56.	St.au2r pre	GTG CAC AGT TAC TTA CAC ATA
57.	Str.ag1r	ATT TTC CAC TCC TAC CAA C
58.	Str.ag3r	CCG TTT CCA AAG CGT ACA AT
59.	Vi.vulr	GCT AAC GTC AAA TGA TAG TGC
60.	Vi.vu2r	GCT AAC GTC AAA TGA TGC CGC
61.	Ye.en1r	AAC AAC GTA TTA AGT TATTGG
62.	10-30f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G

Vorzugsweise wird erfindungsgemäß eine weitere Hybridisierung mittels mindestens einer Hybridisierungssonde durchgeführt, die von der ersten Hybridisierungssonde unterschiedlich ist, aber auch eine der Seq. ID Nr. 1 - 61 aufweist. Dies führt dann entweder zum Auftreten oder zum Ausbleiben von Kreuzreaktionen. Diese

Information kann dann zur eindeutigen Identifikation der Mikroorganismen oder eines Mikroorganismenensembles in einer Probe heranzogen werden.

Vorteilhaft am erfindungsgemäßen Verfahren ist mithin die Möglichkeit, in eindeutiger Weise bestimmte Mikroorganismen allein oder ein Ensemble von Mikroorganismen simultan zu bestimmen. Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse kann dann beispielsweise durch eine zweidimensionale Auftragung der Hybridisierungsergebnisse erfolgen. Es ergibt sich dabei ein bestimmtes Hybridisierungsmuster, welches indikativ für ein bestimmtes Mikroorganismenensemble ist. Solche Muster können z.B. in Datenbanken abgelegt werden. Insbesondere bei Reihenuntersuchungen können solche Muster abgefragt werden und zur schnellen und sicheren Identifizierung eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich mithin insbesondere für automatisierbare Untersuchungen.

Vorzugsweise erfolgt eine Detektion der Kreuzreaktion räumlich und/oder zeitlich oder durch verschiedene Markierungen der Sonden.

Vorzugsweise kann die räumliche Anordnung der Hybridisierungsergebnisse auf einem Substrat erfolgen. Als Substrate kommen beliebige, in der Molekularbiologie gebräuchliche Trägersysteme in Betracht, wie beispielsweise Mikrotiterplatten, Blotting-Papiere, Spezialmembranen oder DNA-Chips.

Eine zeitliche Auflösung der Kreuzreaktion bietet sich bei Durchflußverfahren an. Es werden der Probe sequentiell Hybridisierungssonden zugesetzt und deren Wechselwirkung mit in der Probe enthaltener Nucleinsäure untersucht.

Alternativ kann auch bei einer statischen Analyse durch Wahl geeigneter Markierungsreagenzien eine zeitliche Aufnahme der Hybridisierungsergebnisse in Mustern erfolgen. Beispielsweise ist dies möglich durch Verwendung von Farbstoffen

unterschiedlicher spektraler Charakteristika oder von Fluoreszenzmarkern mit kurzer, unterschiedlicher oder zeitversetzter Lebensdauer. Auch die in zeitlicher Abhängigkeit aufgenommenen Hybridisierungsmuster können in Datenbanken abgelegt werden und dann bei Abgleich mit einer aktuellen Probe als Hinweis für den mikrobiologischen Zustand dieser Probe dienen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mithin auch Oligonucleotide mit denen in Seq. Id. Nr. 1 - 61 wiedergegebenen Sequenzen.

Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können insbesondere in Form von Kits zusammen mit Hilfsmitteln zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angeboten werden. In vorteilhafter Weise sind dabei die Oligonucleotide auf einem Substrat angeordnet. Die Anordnung kann insbesondere in festen Zuordnungen erfolgen, so daß bei positiver Hybridisierung eine Detektion auf einem Substrat jeweils an einer standardisierten gleichen Stelle erscheint, was eine Automatisierung der Auswertung erleichtert.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Voranreicherung und Extraktion der Mikroorganismen

Zur Voranreicherung werden 100 ml des Probenmaterials mit 300 ml nicht selektivem Flüssigmedium (CASO-Bouillon), versetzt und für 4 - 18 h im Brutschrank bei 28 - 37°C (abhängig von den Zielorganismen) bebrütet. Anschließend erfolgt die Entnahme von 1,5 ml dieser Flüssiganreicherung für die nachfolgende Extraktion der DNA. Diese Lösung wird für 2 min bei 8000 g

zentrifugiert, der entstandene Überstand verworfen und das Sediment (Pellet) in 100 µl Puffer 1 (2 mg/ml Lysozym, 20 µg/ml Lysostaphin, 100 mM Tris/HCl pH 7,2 - 7,4, 2 mM CaCl₂, 4 % Saccharose-Lösung, Proteinase K-Lösung (20 mg/ml H₂O)) resuspendiert. Danach erfolgt die Zugabe von 20 µl RNase A-Lösung (20 mg/ml in Natriumacetatpuffer, pH 5,2) und Vermischung der Suspension auf dem Schüttler. Im Anschluß daran wird das Gemisch für 10 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend werden dieser Lösung 100 µl Puffer 2 (10% SDS-Lösung, 1,5 mM EDTA) zugegeben und nochmals für 10 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reinigung der DNA erfolgt mittels DNA-Reinigungssäulen (QIAamp von QIAGEN). Hierzu wird die Lösung mit 200 µl Bindungspuffer (AL-Puffer QIAGEN) und 200 µl absolutem Alkohol versetzt und auf dem Schüttler gut durchmischt. Das gesamte Volumen wird anschließend auf eine Reinigungssäule (in einem Leertube fixiert) gegeben und für 1min bei 8000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen, die Reinigungssäule in ein neues Leertube gegeben und mit 500 µl Waschpuffer (AW-Puffer von QIAGEN) beschickt. Es folgt eine erneute Zentrifugation für 1min bei 8000 g und Verwerfen des entstandenen Zentrifugates. Danach werden 200 µl H₂O (auf 60°C vorgewärmt) zugegeben und für 1min bei 8000 g zentrifugiert. Die auf diesem Wege eluierte DNA kann nun für die nachfolgende Identifizierung mittels PCR herangezogen werden.

Identifizierung der Mikroorganismen mittels PCR

Zur Durchführung der PCR werden folgende Reaktionskomponenten miteinander vermischt:

10 x PCR-Puffer (0,1 % Tween, 660 mM Tris/HCl pH 8,8, 166 mM (NH₄)₂SO₄

5,0 µl

MgCl₂ (25 mM) 5,0 µl

dNTP's (je 2 mM) 5,0 µl

Taq-Polymerase (5 U/µl) 0,2 µl

DNA-Template (0,2 ng/µl) 5,0 µl

Primer A (30 pmol) 1,0 µl

Primer B (30 pmol) 1,0 µl

H₂O 27,8 µl

Die Amplifikation der Ziel-DNA (Target-DNA) erfolgt in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700 von Perkin Elmer) mit vorzugsweise beheiztem Deckel. Hierbei wird die DNA zuerst für 5 min bei 94°C denaturiert und anschließend für 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

30 sec 94°C Zyklus-Denaturierung

15 sec 56°C Primer-Hybridisierung („Annealing“)

20 sec 72°C Elongation („Extension“)

Zum Abschluß des PCR-Programmes erfolgt eine nochmalige Elongation bei 72°C für 1min.

Die Auswahl der Starteroligonucleotide (Primer) bestimmt letztendlich die Taxonspezifität der PCR-Amplifikation und ermöglicht somit die Identifizierung der in der Probe vorhandenen Bakterien. Hierbei kann der Primer A sowohl zur taxonspezifischen Hybridisierung an einen variablen Bereich der Ziel-DNA, als auch zur breitbandspezifischen Hybridisierung an einen in allen Bakterien homologen Sequenzbereich dienen. Hingegen hybridisiert Primer B an einen artspezifischen Sequenzbereich der Bakterien-DNA und ist somit der entscheidende Faktor zur Bestimmung der Spezies/Gattung oder Gruppe. Für jeden

nachzuweisenden Organismus werden die jeweils benötigten Starteroligonucleotide A und B benötigt.

Beispiel 2: Milch

Bei den zum Nachweis in Milch relevanten Bakterien handelt es sich in erster Linie um folgende Gattungen/Spezies:

E. coli

Campylobacter spezies

Listeria spezies

Salmonella spezies

Zur Identifizierung der oben genannten Bakterien werden die nachfolgend aufgeführten DNA-Starteroligonucleotide herangezogen:

Gattung/Spezies	Starteroligonucleotid A	Starteroligonucleotid B
E.coli	10-30f (Seq. ID. Nr. 62)	Es.co3r (ID-Nr. 32)
Campylobacter spezies	10-30f	Ca.je1r (ID-Nr. 20)
Listeria spezies	10-30f	Li.mo2r (ID-Nr. 41)
Salmonella spezies	10-30f	Sa.xx5r (ID-Nr. 53)

Beispiel 3: Wasser

Bei den zum Nachweis in Wasser relevanten Bakterien handelt es sich in erster Linie um folgende Gattungen/Spezies:

E.coli

Enterobacter aerogenes

Klebsiella oxytoca

Pseudomonas aeruginosa

Enterobakterien⁶⁾

Zur Identifizierung der oben genannten Bakterien werden die nachfolgend aufgeführten DNA-Starteroligonucleotide herangezogen:

Gattung/Spezies	Starteroligonucleotid A	Starteroligonucleotid B
E.coli	10-30f	Es.co3r (ID-Nr. 32)
Enterobacter aerogenes	10-30f	En.ae2r (ID-Nr. 29)
Klebsiella oxytoca	10-30f	Kl.ox3r (ID-Nr. 38)
Pseudomonas aeruginosa	10-30f	Ps.ae1r (ID-Nr. 49)
Enterobakterien ⁶⁾	10-30f	Gamma1r (ID-Nr.36)

⁶⁾ Citrobacter freundii, Edwardsiella tarda, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli/S.spp., Hafnia alvei, Klebsiella oxytoca, Plesiomonas shigelloides, Salmonella Typhimurium, Serratia marcescens, Vibrio vulnificus, Yersinia enterocolitica

Beispiel 4: Für unterschiedliche in der Praxis vorkommende Proben wurden artificielle Gemische im Experiment untersucht (Tabelle 2)

Häufige Fragestellungen in der Praxis erfordern vielfach eine Identifizierung von ganz bestimmten Keimen oder eines reduzierten Artenspektrums. Dies liegt in den ganz unterschiedlichen Wachstumsanforderungen der Bakterien begründet, das heißt, daß nicht alle Bakterienarten gleichsam in unterschiedlichen Proben wachsen oder leben können. Hieraus ergibt sich für Untersuchungen an Proben häufig die Bestimmung ganz bestimmter Bakterienarten, -gattungen, oder -gruppen (Beispiele 2 und 3). In Tabelle 1 sind Identifizierungen von Organismen dargestellt, die in ganz unterschiedlichen artifiziellen Gemischen hinsichtlich dieser Prämisse geprüft und einwandfrei bestimmt werden konnten.

Zur Identifizierung werden die Amplifikate der PCR-Reaktion auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und bei 5 - 6 V/cm Elektrodenabstand im elektrischen Feld durch Horizontalgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wird das Agarosegel für 10min in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromid/TAE-Puffer-Lösung gefärbt und unter einem UV-Transilluminator bei 254 nm photodokumentiert.

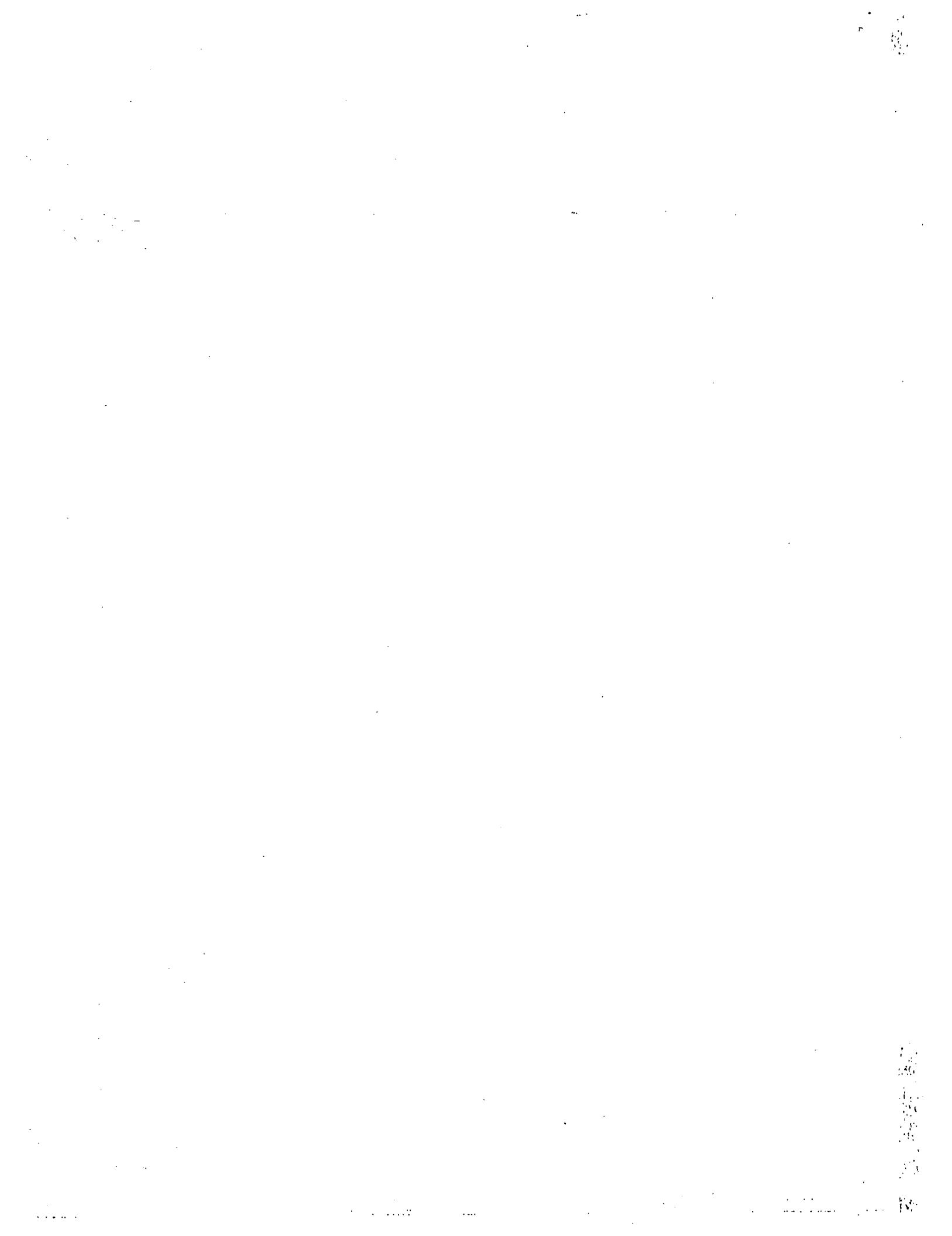
Die entwickelten Starteroligonucleotide weisen die genannten Bakterien auch in Mischproben hochspezifisch nach. Sofern eine Probe eine oder mehrere der gesuchten Bakterien enthält, wird dies durch eine Bande mit definierter Größe auf dem Elektrophoresegel sichtbar.

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von in Tabelle 1 angegebenen Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen dieser Taxa enthalten kann, mittels Nucleinsäurehybridisierungstechniken bei Verwendung von Oligonucleotiden mit der Seq. ID. No 1 bis 62 als Sonden, unter Erhalt eines Hybridisierungsergebnisses, wobei für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei mittels einer Kreuzreaktion durch Zugabe mindestens einer zweiten von der ersten Sonde verschiedenen Hybridisierungssonde, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Oligonucleotide mit den Seq. ID No 1 bis 62 nach Maßgabe der in Tabelle 1 erfolgten Zuordnung, eine eindeutige Identifizierung des nachzuweisenden Mikroorganismus oder Gruppe von Mikroorganismen erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei eine Detektion der Kreuzreaktion räumlich und/oder zeitlich aufgelöst erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion durch Verwendung unterschiedlicher Markierungen der Hybridisierungssonden erfolgt.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsergebnisse auf einem Substrat angeordnet sind.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die auf dem Substrat angeordneten Hybridisierungsergebnisse ein für die nachzuweisenden Mikroorganismen charakteristisches Muster ergeben.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hybridisierungsergebnis in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das zeitlich aufgenommene Hybridisierungsmuster spezifisch für die nachzuweisenden Mikroorganismen oder ein Ensemble von Mikroorganismen ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Hybridisierungsmuster durch Aufnahme von Hybridisierungsergebnissen erstellt wird, die durch Sonden mit unterschiedlicher Markierung erstellt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat ein DNA-Chip ist.
11. Substrat mit mindestens einer Art von Oligonucleotiden gemäß Seq. ID. No 1 - 61.
12. Substrat nach Anspruch 11, wobei das Substrat als DNA-Chip ausgebildet ist.

13. Kit enthaltend mindestens ein Oligonucleotid mit der Seq. Id. No 1 - 62, ggf. auf mindestens einem Substrat nach einem der Ansprüche 11 oder 12 sowie Hilfsmittel zu Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
14. Oligonucleotide mit den in Seq. Id. Nr. 1 - 61 wiedergebenen Sequenzen.



**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

Internationales Büro

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/22023
C12Q 1/68		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP98/06863	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum:	29. Oktober 1998 (29.10.98)	
(30) Prioritätsdaten:		
197 47 731.3	29. Oktober 1997 (29.10.97)	DE
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): MIRA DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).		
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LEISER, Matthias [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE). EP-PING, Bernd [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).		<i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 16. September 1999 (16.09.99)

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING MICRO-ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN

(57) Abstract

A method for identifying micro-organisms belonging to various taxes of micro-organisms, as specified in table 1, in a sample which can contain a plurality of various micro-organisms of said taxes, by means of nucleic acid hybridization techniques using oligo nucleotides with sequence ID. No. 1-62 as probes in order to obtain a hybridization result, whereby at least one hybridization result is obtained for each micro-organism to be identified.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zum Nachweis von in Tabelle 1 angegeben Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen dieser Taxa enthalten kann, mittels Nucleinsäurehybridisierungstechniken bei Verwendung von Oligonucleotiden mit der Seq. ID. No 1 bis 62 als Sonden, unter Erhalt eines Hybridisierungsergebnisses, wobei für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakia
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Ettland						

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER⁶:

IPC6. C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6. C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV; JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4 January 1996 (04.01.96) cited in the application see page 41, line 30 - page 42, line 16; claims 33, 34, see page 95, see page 71, see page 1, line 1 - page 3, line 23, see page 53, line 16 - page 54, line 4; examples 2, 9, see page 91, columns 9-22	1,5,6
Y	WAGNER M ET AL; "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, (1994 MAR) 60 (3) 792-800., XP002096198 see the whole document	10
X	---	1,5,6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 2 July 1999 (02.07.99)	Date of mailing of the international search report 19 July 1999 (19.07.99)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/06863

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Database Empatent, Entry E04712, Account No. E04712, 8 October 1997 (08.10.97), "Probe DNA for drug sensitivity analysis" XP002108049 see abstract & JP 1993 000 100 A (NIPPON FLOUR MILLS CO LTD) 8 January 1993 (08.01.93)	1-4
A	WO 93 04199 A (SCIENT GENERICS LTD) 4 March 1993 (04.03.93) see example 4	1-4
A	EP 0 318 245 A (ML TECHNOLOGY VENTURES) 31 May 1989 (31.05.89), see example 1	1-4
P,X	WO 97 41253 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH; LEISER ROBERT MATTHIAS (DE); SPERVERSLAGE JE) 6 November 1997 (06.11.97) cited in the application, see the whole documet	1-13

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IBRAHIM A ET AL: "Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus Acinetobacter as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, (1997 Jul) 47 (3) 837-41., XP002096199 see page 840, line 53 - page 841 line 31; figure 3 see page 837 - page 839, line 5	13
Y	GUSCHIN D Y ET AL: "OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS AS GENOSENSORS FOR DETERMINATIVE AND ENVIRONMENTAL STUDIES IN MICROBIOLOGY" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, volume 63, No. 6, June 1997, pages 2397-2402, XP002064989 see the whole document	10 1-3,5,6,11,12
X	WO 95 24574 A (MICROPROBE CORP; BRITISCHGI THERESA B (US); CANGELOSI GERARD A (US) 21 December 1995 (21.12.95) see page 42; table 5	1-4
Y	RAINEY F A ET AL: "The phylogenetic structure of the genus Acinetobacter" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, (15 December 1994) 124 (3) 349-52., XP002096200, see the whole document	1,5,6,11, 13,14
Y	ENRIGHT M C ET AL: "PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN SOME MEMBERS OF THE GENERA NEISSERIA, ACINETOBACTER, MORAXELLA, AND KINGELLA BASED ON PARTIAL 16S RIBOSOMAL DNA SEQUENCE ANALYSIS" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, volume 44, No. 3, July 1994, pages 386-391, XP000605280, see abstract; table 1	1,5,6,11, 13,14
Y	US 5 541 308 A (HOGAN JAMES J ET AL) 30 July 1996 see abstract, see column 1- column 2, line 6, see column 5, line 43 - column 8, line 6	1,5,6 11,13,14
A	EHRMANN M ET AL: "REVERSE DOT BLOT HYBRIDIZATION: A USEFUL METHOD FOR THE DIRECT IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED FOOD" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1994, pages 143-149, XP000612834, see abstract, figure 1; table 2	1-3,5,6, 11
A	BRAUN-HOWLAND E B ET AL: "USE OF A SIMPLIFIED CELL BLOT TECHNIQUE AND 16S rRNA-DIRECTED PROBES FOR IDENTIFICATION OF COMMON ENVIRONMENTAL ISOLATES" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, volume 59, No. 10, October 1993, pages 3219-3224, XP000604178 see the whole document	1-3,5, 13,14

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-14

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 1), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

2. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 2), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

3. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 3), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

4. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 4), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

5. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 5), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

6. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 6), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

7. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 7), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

8. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 8), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

9. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 9), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

10. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 10), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

11. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 11), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

12. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 12), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

13. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 13), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

14. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 14), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

15. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 15), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

16. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 16), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

17. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 17), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

18. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 18), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

19. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 19), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

20. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 20), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

21. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 21), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

22. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 22), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

23. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 23), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

24. . Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 24), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

25. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 25), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

26. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 26), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

27. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 27), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

28. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 28), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

29. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 29), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

30. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 30), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

31. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 31), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

32. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 32), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

33. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 33), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

34. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 34), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

35. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 35), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

36. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 36), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

37. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 37), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

38. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 38), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

39. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 39), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

40. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 40), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

41. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 41), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

42. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 42), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

43. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 43), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

44. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 44), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

45. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 45), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

46. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 46), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

47. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 47), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

48. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 48), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

49. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 49), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

50. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 50), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

51. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 51), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

52. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 52), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

53. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 53), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

54. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 54), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

55. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 55), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

56. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 56), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

57. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 57), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

58. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 58), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

59. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 59), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

60. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 60), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

61. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 61), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

62. Claims Nos. 1,5-10, 13 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 62), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

63. Claims Nos. 2-4 (in full); 1, 5-13 (in part)

Specific and cross-reactive, non specific 16S RNA probe combinations, as cited in table 1, identification methods using these probe combinations and substrates and kits containing these probe combinations.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9600298	A	04-01-1996	AU	2924695 A	19-01-1996
			BR	9508101 A	30-12-1997
			CA	2193101 A	04-01-1996
			CZ	9603819 A	15-04-1998
			EP	0769068 A	23-04-1997
			JP	10501976 T	24-02-1998

WO 9534574	A	21-12-1995	AU	2865495 A	05-01-1996
			EP	0804455 A	05-11-1997
			US	5712095 A	27-01-1998
			US	5770373 A	23-06-1998
			US	5726021 A	10-03-1998

US 5541308	A	30-07-1996	US	5683876 A	04-11-1997
			US	5677127 A	14-10-1997
			US	5677128 A	14-10-1997
			US	5677129 A	14-10-1997
			US	5827651 A	27-10-1998
			US	5693468 A	02-12-1997
			US	5691149 A	25-11-1997
			US	5693469 A	02-12-1997
			US	5679520 A	21-10-1997
			US	5714321 A	03-02-1998
			US	5674684 A	07-10-1997
			US	5840488 A	24-11-1998
			US	5595874 A	21-01-1997
			US	5547842 A	20-08-1996
			US	5593841 A	14-01-1997
			AT	163680 T	15-03-1998
			AU	616646 B	07-11-1991
			AU	1041988 A	16-06-1988
			CA	1339871 A	19-05-1998
			DE	3752172 D	09-04-1998
			DE	3752172 T	02-07-1998
			DK	413788 A	23-09-1988
			EP	0272009 A	22-06-1988
			ES	2112824 T	16-04-1998
			FI	883482 A	22-07-1988
			JP	10042880 A	17-02-1998
			JP	1503356 T	16-11-1989
			KR	9511719 B	09-10-1995
			PT	86204 A,B	01-12-1987
			WO	8803957 A	02-06-1988

WO 9304199	A	04-03-1993	NONE		

EP 0318245	A	31-05-1989	US	5030557 A	09-07-1991
			AT	106947 T	15-06-1994
			AU	2611288 A	14-06-1989
			CA	1319336 A	22-06-1993
			DE	3850055 D	14-07-1994
			DE	3850055 T	29-09-1994
			DK	361289 A	20-09-1989
			ES	2056115 T	01-10-1994
			FI	893526 A	21-07-1989
			JP	2502250 T	26-07-1990
			JP	2820749 B	05-11-1998
			KR	9615893 B	23-11-1996

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0318245 A		PT	89050 A,B	01-12-1988
		WO	8904876 A	01-06-1989
WO 9741253 A	06-11-1997	DE	19616750 A	06-11-1997
		AU	2888497 A	19-11-1997



(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/23605 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US:* BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, 10589 Berlin (DE)).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08808 (72) Erfinder; und
- (22) Internationales Anmeldedatum: 8. September 2000 (08.09.2000) (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US:* FANDKE, Markus [DE/DE]; Genter Strasse 7, 13353 Berlin (DE); GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, 13359 Berlin (DE); BERGHOFF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländer Weg 85, 12355 Berlin (DE)).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHAUSSER; Maximilianstrasse 58, 80538 München (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 19945 964.9 24. September 1999 (24.09.1999) DE

{Fortsetzung auf der nächsten Seite}

(54) Title: METHOD AND NUCLEIC ACIDS FOR DETERMINING THE PRESENCE OF MICRO-ORGANISMS SPECIFIC TO THE BREWING PROCESS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND NUKLEINSÄUREN ZUM NACHWEIS VON BRAUEREIRELEVANTEN MIKROORGANISMEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for determining the presence of micro-organisms specific to the brewing process, in addition to nucleic acids and combinations thereof which can be used in said method. The invention also relates to the use of the inventive nucleic acids or combinations thereof for determining and/or identifying and/or classifying different genera or species of micro-organisms specific to the brewing process. The invention aims to provide a method and a means of rapidly testing beer and brewing raw materials for contamination by micro-organisms, whereby the test should encompass the whole range of possible beer-contaminative micro-organisms. This is achieved by a method which comprises the following steps: (a) the sample is brought into contact with a combination of at least two first nucleic acid molecules (primers) which hybridise with a conserved area of the microbial nucleic acid in micro-organisms specific to the brewing process; (b) amplification of the microbial nucleic acid or a portion thereof, in order to create at least one amplification fragment; (c) the amplification fragment obtained in step (b) is brought into contact with at least a second nucleic acid molecule (probe) which specifically hybridises with at least one amplification fragment comprising a sequence of the microbial nucleic acid specific to all the micro-organisms present in the brewing process, or specific to one or more families, genera or species of said micro-organisms; and (d) determining the presence of at least one hybrid nucleic acid which consists of an amplification fragment and a second nucleic acid molecule, introduced in step (c). The invention also relates to nucleic acid molecules which can be used according to the invention in said method.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von brauereirelevanten Mikroorganismen sowie Nukleinsäuren und Kombinationen derselben, die in diesem Verfahren eingesetzt werden können. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Kombinationen derselben zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren verschiedener Gattungen oder Arten von brauereirelevanten Mikroorganismen. Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren sowie Mittel anzugeben, die ein Schnelltest auf Kontamination von Bier und Brauereirohstoffen durch Mikroorganismen ermöglichen, wobei der Test den Nachweis der gesamten Bandbreite an möglichen bierkontaminierenden Mikroorganismen erfassen soll. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, das folgende Schritte umfasst: (a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuremolekülen (Primern), die mit einem in brauereirelevanten Mikroorganismen konservierten Bereich einer mikrobiellen Nukleinsäure hybridisieren; (b) Amplifizieren der mikrobiellen Nukleinsäure oder eines Teils derselben zur Erzeugung von mindestens einem Amplifikationsfragment; (c) Inkontaktbringen der in Schritt (b) erhaltenen Amplifikationsfragmente mit mindestens einem zweiten Nukleinsäuremolekül (Sonde), welches mit mindestens einem Amplifikationsfragment spezifisch hybridisiert, das eine für sämtliche brauereirelevanten Mikroorganismen oder für eine oder mehrere Familien, Gattungen oder Arten von brauereirelevanten Mikroorganismen spezifische Sequenz der mikrobiellen Nukleinsäure umfasst; und (d) Nachweis von mindestens einer Hybridnukleinsäure, die aus einem Amplifikationsfragment und einem im Schritt (c) eingebrachten zweiten Nukleinsäuremolekül besteht. Ferner werden Nukleinsäuremoleküle angegeben, die in dem Verfahren gemäß der Erfindung eingesetzt werden können.

WO 01/23605 A3

- (81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
- Veröffentlicht:**
— mit internationalem Recherchenbericht
- (88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:** 21. Februar 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/08808

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7: C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7: C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 484 909 A (NIETUPSKI RAYMOND M ET AL) 16 January 1996 (16.01.96) in the cited application Claims 1-11; Example 3	1-8
X	SATOKARI REETTA ET AL: "Detection of beer spoilage bacteria Megasphaera and Pectinatus by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, Vol. 45, Nr. 2, 08 December 1998 (08.12.98), Pages 119-127. XP001002138 ISSN: 0168-1605 the whole document	1-8

Further documents are listed in the continuation of box C

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 May 2001 (18.05.01)

Date of mailing of the international search report
26 September 2001 (26.09.01)

Name and mailing address of the ISA

Authorized officer

European Patent Office

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/08808

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 196 16 750 A (NEWLAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH) 06 November 1997 (06.11.97) Page 2, Line 24 –Page 3, Line 49; Claims 1-12; Examples 1-4	1-8
X	WO 99 22023 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH; EPPING BERND (DE); LEISER MATTHIAS (DE)) 06 May 1999 (06.05.99) Page 5, last paragraph; Claim 1; Table 1	1-8
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Vol. 017, no. 278 (C-1065) 28 May 1993 (28.05.93) & JP 05 015400 A (SAPPORO BREWERIES LTD), 26 January 1993 (26.01.93) Abstract	1, 8-16, 19, 20, 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/08808

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-16, 18-20 (in part) 26 (in full)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority found that this International Application contains several inventions or groups of inventions, as follows:

1. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 26 (in full)

Invention 1:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 1, 21, 73, 74, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of *Lactobacillus brevis* that is specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

2. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 27 (in full)

Invention 2:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 2, 22, 75, 76, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of *Lactobacillus lindneri* that is specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

3. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 28, 29 (in full)

Invention 3:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 3-5, 23, 77-81, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of *Lactobacillus casei* or *paracasei* that are specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

4. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 30, 31 (in full)

Invention 4:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 6, 7, 24, 82, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of *Lactobacillus coryniformis* that is specific to the brewing process. Applications, methods and kits that use or contain said nucleic acids.

5. Claims nos: 1-16, 18-20 (in part), 32 (in full)

Invention 5:

A nucleic acid molecule as a probe or primer in accordance with SEQ ID NO: 8, 25, 83, or derivatives and combinations thereof for determining the presence of

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ; JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4. Januar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 41, Zeile 30 - Seite 42, Zeile 16; Ansprüche 33,34 siehe Seite 95 siehe Seite 71 siehe Seite 1, Zeile 1 - Seite 3, Zeile 23 siehe Seite 53, Zeile 16 - Seite 54, Zeile 4; Beispiele 2,9 siehe Seite 91, Spalte 9-22 ----	1,5,6
Y	-----	10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch das das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

2. Juli 1999

19.07.99

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WAGNER M ET AL: "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, (1994 MAR) 60 (3) 792-800., XP002096198 siehe das ganze Dokument ---	1,5,6
X	IBRAHIM A ET AL: "Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus Acinetobacter as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, (1997 JUL) 47 (3) 837-41., XP002096199 siehe Seite 840, Zeile 53 - Seite 841, Zeile 31; Abbildung 3 siehe Seite 837 - Seite 839, Zeile 5 ---	13
Y	GUSCHIN D Y ET AL: "OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS AS GENOSENSORS FOR DETERMINATIVE AND ENVIRONMENTAL STUDIES IN MICROBIOLOGY" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 63, Nr. 6, Juni 1997, Seiten 2397-2402, XP002064989 siehe das ganze Dokument ---	1,5,6, 11,14
A	WO 95 34574 A (MICROPROBE CORP ;BRITISCHGI THERESA B (US); CANGELOSI GERARD A (US) 21. Dezember 1995 siehe Seite 42; Tabelle 5 ---	1-3,5,6, 11,12
X	RAINEY F A ET AL: "The phylogenetic structure of the genus Acinetobacter" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, (1994 DEC 15) 124 (3) 349-53., XP002096200 siehe das ganze Dokument ---	1-4
Y	ENRIGHT M C ET AL: "PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN SOME MEMBERS OF THE GENERA NEISSERIA, ACINETOBACTER, MORAXELLA, AND KINGELLA BASED ON PARTIAL 16S RIBOSOMAL DNA SEQUENCE ANALYSIS" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Bd. 44, Nr. 3, Juli 1994, Seiten 387-391, XP000605280 siehe Zusammenfassung; Tabelle 1 ---	1,5,6, 11,13,14
		-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 541 308 A (HOGAN JAMES J ET AL) 30. Juli 1996 siehe Zusammenfassung siehe Spalte 1 - Spalte 2, Zeile 6 siehe Spalte 5, Zeile 43 - Spalte 8, Zeile 6 ---	1,5,6, 11,13,14
A	EHRMANN M ET AL: "REVERSE DOT BLOT HYBRIDIZATION: A USEFUL METHOD FOR THE DIRECT IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED FOOD" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1994, Seiten 143-149, XP000612834 siehe Zusammenfassung; Abbildung 1; Tabelle 2 ---	1-3,5,6, 11
A	BRAUN-HOWLAND E B ET AL: "USE OF A SIMPLIFIED CELL BLOT TECHNIQUE AND 16S rRNA-DIRECTED PROBES FOR IDENTIFICATION OF COMMON ENVIRONMENTAL ISOLATES" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 59, Nr. 10, Oktober 1993, Seiten 3219-3224, XP000604178 siehe das ganze Dokument ---	1-3,5, 13,14
A	Database Empatent Entry E04712 Acc. Nr. E04712, 08-10-1997 "Probe DNA for drug sensitivity analysis" XP002108049 siehe Zusammenfassung & JP 1993 000 100 A (NIPPON FLOUR MILLS CO LTD) 8. Januar 1993 ---	1-4
A	WO 93 04199 A (SCIENT GENERICS LTD) 4. März 1993 siehe Beispiel 4 ---	1-4
A	EP 0 318 245 A (ML TECHNOLOGY VENTURES) 31. Mai 1989 siehe Beispiel 1 ---	1-4
P,X	WO 97 41253 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH ;LEISER ROBERT MATTHIAS (DE); SPERVERSLAGE JE) 6. November 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
1-14

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 16), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

17. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 17), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

18. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 18), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

19. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 19), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

20. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 20), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

21. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 21), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

22. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 22), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

23. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 23), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
24. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)	Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 24), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.
25. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)	Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 25), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.
26. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)	Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 26), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.
27. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)	Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 27), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.
28. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)	Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 28), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.
29. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)	Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 29), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.
30. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)	Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 30), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.
31. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)	Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 31), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

32. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 32), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

33. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 33), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

34. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 34), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

35. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 35), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

36. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 36), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

37. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 37), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

38. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 38), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

39. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 39), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

40. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 40), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

41. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 41), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

42. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 42), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

43. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 43), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

44. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 44), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

45. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 45), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

46. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 46), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

47. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 47), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

dieses Oligonukleotid beinhalten.

48. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 48), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

49. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 49), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

50. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 50), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

51. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 51), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

52. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 52), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

53. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 53), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

54. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 54), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

55. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 55), Nachweisverfahren die

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

56. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 56), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

57. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 57), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

58. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 58), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

59. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 59), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

60. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 60), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

61. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 61), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

62. Ansprüche: 1, 5-10, 13 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 62), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

63. Ansprüche: 2-4 (komplett), 1,5-13 (teilweise)

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>In Tabelle 1 angegebene Kombinationen von spezifischen mit kreuzreaktiven, unspezifischen 16S-RNA Sonden, Nachweisverfahren die diese Sondenkombinationen benutzen und Substrate und Kits die diese Sondenkombinationen beinhalten.</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06863

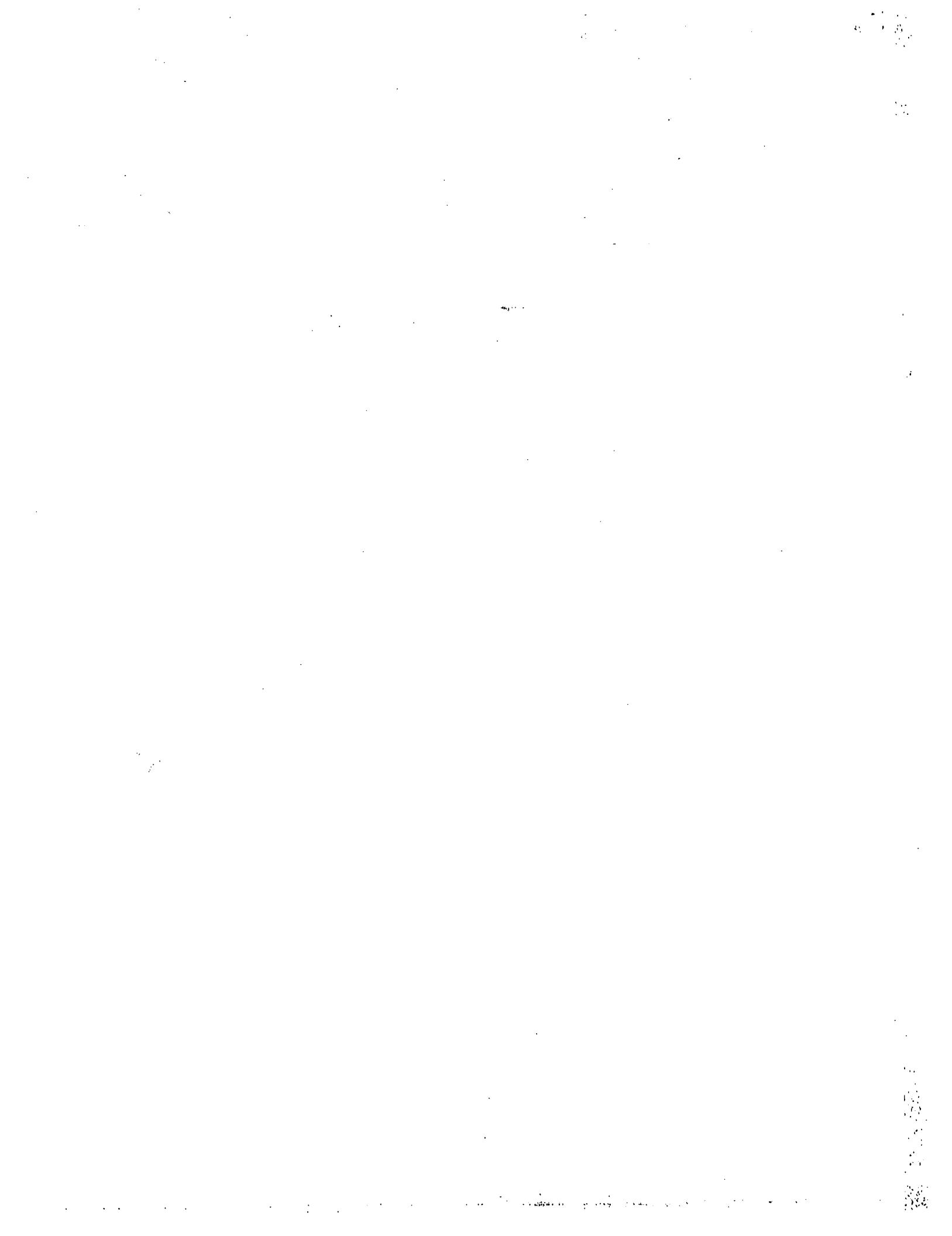
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9600298	A	04-01-1996	AU 2924695 A BR 9508101 A CA 2193101 A CZ 9603819 A EP 0769068 A JP 10501976 T	19-01-1996 30-12-1997 04-01-1996 15-04-1998 23-04-1997 24-02-1998
WO 9534574	A	21-12-1995	AU 2865495 A EP 0804455 A US 5712095 A US 5770373 A US 5726021 A	05-01-1996 05-11-1997 27-01-1998 23-06-1998 10-03-1998
US 5541308	A	30-07-1996	US 5683876 A US 5677127 A US 5677128 A US 5677129 A US 5827651 A US 5693468 A US 5691149 A US 5693469 A US 5679520 A US 5714321 A US 5674684 A US 5840488 A US 5595874 A US 5547842 A US 5593841 A AT 163680 T AU 616646 B AU 1041988 A CA 1339871 A DE 3752172 D DE 3752172 T DK 413788 A EP 0272009 A ES 2112824 T FI 883482 A JP 10042880 A JP 1503356 T KR 9511719 B PT 86204 A,B WO 8803957 A	04-11-1997 14-10-1997 14-10-1997 14-10-1997 27-10-1998 02-12-1997 25-11-1997 02-12-1997 21-10-1997 03-02-1998 07-10-1997 24-11-1998 21-01-1997 20-08-1996 14-01-1997 15-03-1998 07-11-1991 16-06-1988 19-05-1998 09-04-1998 02-07-1998 23-09-1988 22-06-1988 16-04-1998 22-07-1988 17-02-1998 16-11-1989 09-10-1995 01-12-1987 02-06-1988
WO 9304199	A	04-03-1993		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06863

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0318245 A	31-05-1989	US	5030557 A	09-07-1991
		AT	106947 T	15-06-1994
		AU	2611288 A	14-06-1989
		CA	1319336 A	22-06-1993
		DE	3850055 D	14-07-1994
		DE	3850055 T	29-09-1994
		DK	361289 A	20-09-1989
		ES	2056115 T	01-10-1994
		FI	893526 A	21-07-1989
		JP	2502250 T	26-07-1990
		JP	2820749 B	05-11-1998
		KR	9615893 B	23-11-1996
EP 0318245 A		PT	89050 A,B	01-12-1988
		WO	8904876 A	01-06-1989
WO 9741253 A	06-11-1997	DE	19616750 A	06-11-1997
		AU	2888497 A	19-11-1997



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08808

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 484 909 A (NIETUPSKI RAYMOND M ET AL) 16. Januar 1996 (1996-01-16) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-11; Beispiel 3 ---	1-8
X	SATOKARI REETTA ET AL: "Detection of beer spoilage bacteria Megasphaera and Pectinatus by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, Bd. 45, Nr. 2, 8. Dezember 1998 (1998-12-08), Seiten 119-127, XP001002138 ISSN: 0168-1605 das ganze Dokument ---	1-8 - / --

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiteilhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts:

18. Mai 2001

26.09.2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gabriels, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08808

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 196 16 750 A (NEWLAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH) 6. November 1997 (1997-11-06) Seite 2, Zeile 24 -Seite 3, Zeile 49; Ansprüche 1-12; Beispiele 1-4 ---	1-8
X	WO 99 22023 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH ;EPPING BERND (DE); LEISER MATTHIAS (DE)) 6. Mai 1999 (1999-05-06) Seite 5, letzter Absatz; Anspruch 1; Tabelle 1 ---	1-8
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 278 (C-1065), 28. Mai 1993 (1993-05-28) & JP 05 015400 A (SAPPORO BREWERIES LTD), 26. Januar 1993 (1993-01-26) Zusammenfassung -----	1,8-16, 19,20,26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/08808

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-16, 18-20 (Teilweise) 26 (Vollständig)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:
1. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 26 (vollständig)	Erfindung 1: Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:1,21,73,74, oder Derivate davon und Kombinationen damit für die Bestimmung des brauereirelevanten <i>Lactobacillus brevis</i> . Anwendungen,Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.
2. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 27 (vollständig)	Erfindung 2: Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:2,22,75,76, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung des brauereirelevanten <i>Lactobacillus lindneri</i> . Anwendungen,Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.
3. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 28,29 (vollständig)	Erfindung 3: Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:3-5,23,77-81, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung der brauereirelevanten <i>Lactobacillus casei</i> und <i>paracasei</i> . Anwendungen,Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.
4. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 30,31 (vollständig)	Erfindung 4: Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:6,7,24,82, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung des brauereirelevanten <i>Lactobacillus coryniformis</i> . Anwendungen,Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.
5. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 32 (vollständig)	Erfindung 5: Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:8,25,83, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung des brauereirelevanten <i>Lactobacillus curvatus</i> .

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.	
6. Ansprüche: 1-17,19,20 (teilweise)	
Erfindung 6:	
Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:98-103, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von alle brauereirelevanten Lactobacillaceae. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.	
7. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 21,33,34 (vollständig)	
Erfindung 7:	
Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:9-10,26,27,35,84-86, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der Gattung Pediococcus. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.	
8. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 22,35-37 (vollständig)	
Erfindung 8:	
Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:11,14,28-30,36,87-93,104, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der Gattung Pectinatus. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.	
9. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 23,38 (vollständig)	
Erfindung 9:	
Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:15,16,31,37,40-72,97,107, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der Gattung Megasphaera. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.	
10. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 24,39 (vollständig)	
Erfindung 10:	
Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:17,18,32,38,94,105, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der	

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	Gattung Selenomonas. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.
11. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 25,40-41 (vollständig)	<p>Erfindung 11:</p> <p>Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:19,20,33,34,39,40-72,95,96,106, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der Gattung Zymophilus. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.</p>
12. Ansprüche: 1-16,19,20 (teilweise)	<p>Erfindung 12:</p> <p>Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:40-47, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von alle brauereirelevanten Bakterien. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.</p>
13. Ansprüche: 1-16,19,20 (teilweise)	<p>Erfindung 13:</p> <p>Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:48-54, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von alle brauereirelevanten Bakterien. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.</p>
14. Ansprüche: 1-16,19,20 (teilweise)	<p>Erfindung 14:</p> <p>Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:55-59, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von alle brauereirelevanten Bakterien. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.</p>
15. Ansprüche: 1-16,19,20 (teilweise)	<p>Erfindung 15:</p> <p>Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:60-72 oder Derivate und Kombinationen davon für die</p>

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bestimmung von alle brauereirelevanten Bakterien.
Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren
benutzen oder enthalten.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08808

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5484909	A	16-01-1996		EP 0674650 A		04-10-1995
				JP 8503620 T		23-04-1996
				WO 9507289 A		16-03-1995
				US 5705339 A		06-01-1998
DE 19616750	A	06-11-1997		AU 2888497 A		19-11-1997
				WO 9741253 A		06-11-1997
WO 9922023	A	06-05-1999		AU 1337099 A		17-05-1999
JP 05015400	A	26-01-1993		JP 3067850 B		24-07-2000

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/23605 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷:

C12Q 1/68

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Tegeler Weg 33, 10589 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/08808

(22) Internationales Anmeldedatum:

8. September 2000 (08.09.2000)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): FANDKE, Markus [DE/DE]; Genter Strasse 7, 13353 Berlin (DE). GASCH, Alexander [DE/DE]; Steegerstrasse 71, 13359 Berlin (DE). BERGHOFF, Kornelia [DE/DE]; Rhodeländer Weg 85, 12355 Berlin (DE).

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, 80538 München (DE).

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

199 45 964.9 24. September 1999 (24.09.1999) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND NUCLEIC ACIDS FOR DETERMINING THE PRESENCE OF MICRO-ORGANISMS SPECIFIC TO THE BREWING PROCESS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND NUKLEINSÄUREN ZUM NACHWEIS VON BRAUEREIRELEVANTEN MIKROORGANISMEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the presence of micro-organisms specific to the brewing process, in addition to nucleic acids and combinations thereof which can be used in said method. The invention also relates to the use of the inventive nucleic acids or combinations thereof for determining and/or identifying and/or classifying different genera or species of micro-organisms specific to the brewing process. The invention aims to provide a method and a means of rapidly testing beer and brewing raw materials for contamination by micro-organisms, whereby the test should encompass the whole range of possible beer-contaminative micro-organisms. This is achieved by a method which comprises the following steps: (a) the sample is brought into contact with a combination of at least two first nucleic acid molecules (primers) which hybridise with a conserved area of the microbial nucleic acid in micro-organisms specific to the brewing process; (b) amplification of the microbial nucleic acid or a portion thereof, in order to create at least one amplification fragment; (c) the amplification fragment obtained in step (b) is brought into contact with at least a second nucleic acid molecule (probe) which specifically hybridises with at least one amplification fragment comprising a sequence of the microbial nucleic acid specific to all the micro-organisms present in the brewing process, or specific to one or more families, genera or species of said micro-organisms; and (d) determining the presence of at least one hybrid nucleic acid which consists of an amplification fragment and a second nucleic acid molecule, introduced in step (c). The invention also relates to nucleic acid molecules which can be used according to the invention in said method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von brauereirelevanten Mikroorganismen sowie Nukleinsäuren und Kombinationen derselben, die in diesem Verfahren eingesetzt werden können. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Kombinationen derselben zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren verschiedener Gattungen oder Arten von brauereirelevanten Mikroorganismen. Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren sowie Mittel anzugeben, die ein Schnelltest auf Kontamination von Bier und Brauereirohstoffen durch Mikroorganismen ermöglichen, wobei der Test den Nachweis der gesamten Bandbreite an möglichen bierkontaminierenden Mikroorganismen erfassen soll. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, das folgende Schritte umfasst: (a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuremolekülen (Primern), die mit einem in brauereirelevanten Mikroorganismen konservierten Bereich einer mikrobiellen Nukleinsäure hybridisieren; (b) Amplifizieren der mikrobiellen Nukleinsäure oder eines Teils derselben zur Erzeugung von mindestens einem Amplifikationsfragment; (c) Inkontaktbringen der in Schritt (b) erhaltenen Amplifikationsfragmente mit mindestens einem zweiten Nukleinsäuremolekül (Sonde), welches mit mindestens einem Amplifikationsfragment spezifisch hybridisiert, das eine für sämtliche brauereirelevanten Mikroorganismen oder für eine oder mehrere Familien, Gattungen oder Arten von brauereirelevanten Mikroorganismen spezifische Sequenz der mikrobiellen Nukleinsäure umfasst; und (d) Nachweis von mindestens einer Hybridnukleinsäure, die aus einem Amplifikationsfragment und einem im Schritt (c) eingebrachten zweiten Nukleinsäuremolekül besteht. Ferner werden Nukleinsäuremoleküle angegeben, die in dem Verfahren gemäß der Erfindung eingesetzt werden können.

WO 01/23605 A2



(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("*Guidance Notes on Codes and Abbreviations*") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren und Nukleinsäuren zum Nachweis von brauereirelevanten Mikroorganismen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von brauereirelevanten Mikroorganismen sowie Nukleinsäuren und Kombinationen derselben, die in diesem Verfahren eingesetzt werden können. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßigen Nukleinsäuren oder Kombinationen derselben zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren verschiedener Gattungen oder Arten von brauereirelevanten Mikroorganismen.

Bier ist als mikrobiologisch sehr stabil anzusehen und kann nur von einer relativ überschaubaren Anzahl von Bakterien verdorben werden. Um eine Kontamination mit diesen Keimen möglichst frühzeitig zu entdecken, muß ein Analysesystem angewendet werden, das eine schnelle Detektion der Keime in der Matrix Bier ermöglicht, da sofort Gegenmaßnahmen ergriffen werden müssen.

Das gemeinsame Merkmal aller bierschädlichen Keime ist die Spurenkontamination einzelner Gebinde (Fässer, Flaschen) und das nur langsame Wachstum. Besonders die mikrobiologische Kultur der anaeroben Keime ist sehr problematisch. Die derzeit bekannten bieverderbenden Bakterien sind folgenden Gattungen zugeordnet: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus*, *Megasphaera*. Vertreter der Gattungen *Selenomonas* und *Zymophilus* sind als Bierkontaminanten zwar noch nicht in Erscheinung getreten, eine Kontamination des Bieres und ihr anschließendes Wachstum darin ist jedoch nicht auszuschließen.

Die Gattung *Lactobacillus* beschreibt Gram-positive, nicht sporenbildende meist unbewegliche und kettenbildende Stäbchen, die lang, schlank und manchmal gebogen sind. Teilweise werden auch kokkoide Formen beobachtet. Vertreter der Gattung *Lactobacillus* sind mikraerophil, z.T. anaerob. Sie sind cytochrom- und katalasennegativ, der Stoffwechsel ist fermentativ und sie benötigen ein komplexes Nährmedium. Der molare G+C-Gehalt der DNA liegt zwischen 32 und 53%. *Lactobacillen* werden außer in Bier in Molkerei- und Getreideproduktten in Fleisch und Fischprodukten nachgewiesen.

Wein, Früchten und Fruchtsäften, sauer eingelegten Gemüsen, Sauerkraut, Silage und Sauerteig gefunden. Sie sind zwar Bestandteil der normalen Mund-, Intestinal- und Vaginalflora von Säugern, jedoch selten pathogen (*Bergeys Manual of Syst. Microbiology*, 1984, S. 1209-1234). In Bier führen sie durch ihre Stoffwechselprodukte zu Trübungen und unerwünschten Geschmacksveränderungen. Für den Bierverderb relevante Arten sind *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus coryniformis* und *Lactobacillus curvatus* (Back, *Brauwelt*, 1980, 120, S. 1562-1569).

Die Gattung *Pediococcus* umfaßt Gram-positive, unbewegliche und nichtsporenbildende Kokken. Sie bilden Tetraden oder liegen paarweise vor. Sie sind fakultativ anaerob, die Sauerstoffempfindlichkeit unterscheidet sich von Art zu Art. *Pediococcen* sind cytochrom- und katalasen negativ und benötigen ein komplexes Nährmedium (*Bergeys Manual of Syst. Microbiology*, 1984, S. 1075-1079). Sie werden als Starterkulturen zur Rohwursterstellung eingesetzt, sie fermentieren verschiedene Sauergemüsearten und führen zum Verderb von Lebensmitteln (Firnhaber, Baumgart: *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln*, 1993, S. 413-419, 115-117). Die Gattung umfaßt 8 Spezies, die Arten *Pediococcus damnosus* und *Pediococcus inopinatus* sind als bierschädlich anzusehen.

Die Gattung *Pectinatus* umfaßt die Arten *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis* und den nicht weiter taxonomisch eingeordneten Stamm *Pectinatus* sp. DSM 20764. Alle Stämme wurden aus verdorbenem Bier isoliert (Schleifer et al, *Int. J. of Syst. Bacteriology*, 1990, S. 19-27). Es handelt sich um leicht gekrümmte, nicht sporenbildende stäbchenförmige Bakterien. Sie sind kammähnlich begeißelt und beweglich. Sie produzieren weder Katalase noch Cytochromoxidase und sind obligat anaerob. Der molare G+C-Gehalt beträgt 38-41%. Die Zellwand der Gattung *Pectinatus*, aber auch die der Gattungen *Megasphaera*, *Selenomonas* und *Zymophilus*, ist den Gram-positiven Bakterien ähnlicher als den Gram-negativen Bakterien. Obwohl die Gram-Färbung negativ ist, werden sie taxonomisch den Gram-positiven Bakterien zugeordnet (Haikara, *The Prokaryotes*, 2. Ausgabe, Band II, 1991, S. 1993-2004).

Die Gattung *Megasphaera* umfaßt die Arten *Megasphaera elsdenii* und *Megasphaera cerevisiae*. Nur *Megasphaera cerevisiae* ist brauereirelevant und wird als Gram-negative, strikt anaerobe, cytochrom- und katalasenegative, unbewegliche und teilweise leicht gestreckte Kokke beschrieben, die einzeln, in Paaren oder in kurzen Ketten vorliegt. Der mittlere Zelldurchmesser liegt bei 1,4 µm, der molare G+C-Gehalt bei 42,4-44,8%. Hauptstoffwechselprodukte sind Schwefelverbindungen wie H₂S und flüchtige Fettsäuren. Eine Kontamination mit *Megasphaera cerevisiae* führt in Bier zu sehr starken Aroma- und Geschmacksveränderungen (Haikara, *The Prokaryotes*, 2. Ausgabe, Band II, 1991, S. 1993-2004).

Spezies der Gattung *Selenomonas* sind definiert als obligat anaerobe, Gram-negative, nicht sporenbildende, leicht gebogene und bewegliche Stäbchen. Der molare G+C-Gehalt liegt bei 48-58% (Schleifer et al, *Int. J. of Syst. Bacteriology*, 1990, S. 19-27). *Selenomonaden* werden isoliert aus dem Magen und Darmtrakt und dem Kot von Säugern. Die Gattung umfaßt 10 Arten (Hespell et al., *The Prokaryotes*, 2. Ausgabe, Band II, 1991, S. 2005-2013). Nur *Selenomonas lacticifex* ist aus Anstellhefe isoliert worden und somit brauereirelevant. Zwar ist *Selenomonas lacticifex* noch nicht als bierverderbendes Bakterium in Erscheinung getreten, ein Wachstum in Bier ist jedoch möglich und somit die Definition eines bierverderbenden Organismus erfüllt.

Zu der Gattung *Zymophilus* gehören die Arten *Zymophilus paucivorans* und *raffinosivorans* als Gram-negative, leicht gekrümmte, bewegliche Stäbchen, die einzeln, paarweise oder in kurzen Ketten auftreten. Der molare G+C-Gehalt liegt bei 38-41%. Sie sind obligat anaerob und führen einen fermentativen Metabolismus. Beide Arten wurden aus Anstellhefen und Brauereiabfällen isoliert, ein Wachstum in Bier ist nur bei *Zymophilus raffinosivorans* beobachtet worden (Schleifer et al, *Int. J. of Syst. Bacteriology*, 1990, S. 19-27).

Basierend auf dem Vergleich der 16S-rRNA-Gensequenzen werden alle zu untersuchenden Gattungen den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt zugeordnet. Die Gattungen *Pediococcus* und *Lactobacillus* werden in die Familie der *Lactobacillaceae* eingeordnet, die Gattungen *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas* und

Zymophilus in die *Sporomusa*-Gruppe. Die *Sporomusa*-Gruppe wird auch als Gruppe der Gram-positiven Eubakterien mit Gram-negativer Zellwand bezeichnet (Stackebrandt et al., *The Prokaryotes*, 2. Ausgabe, Band II, 1991, S. 25-26, 33).

Eine klassische mikrobiologische Bestimmung der oben beschriebenen Keime kann bis zu 10 Tage in Anspruch nehmen. Wünschenswert ist jedoch eine deutlich schnellere Analyse, da ansonsten unnötige Lagerungskosten entstehen oder das untersuchte Bier schon ausgeliefert worden ist. Aus diesem Grunde sind bereits mehrere Schnellnachweisverfahren entwickelt worden. So können beispielsweise Bierschädlinge aufgrund ihrer Stoffwechselprodukte detektiert werden (Haikara et al., *Microbiology*, 1995, 141, S. 1131-1137). Weitere indirekte Methoden sind die Turbidometrie (Haikara et al., *ASBC*, 1990, S. 92-95) und die Messung der ATP-Biolumineszenz (Miller et al., *J. Inst. Brew.*, 1989, Band 95, S. 317-319). Schnell und spezifisch ist auch der Nachweis mittels Antikörpern (Gares et al., *ASBC*, 1993, S. 158-163; Winnewisser et al., *Int. J. of Bacteriology*, 1995, 45, S. 403-405). Bei diesen Methoden liegt der Nachteil darin, daß entweder unspezifische Parameter untersucht werden oder nur jeweils eine Spezies oder Gattung nachgewiesen wird. Auch ist der apparative und personelle Aufwand groß. Einen Überblick über Schnellmethoden zum Nachweis von brauereirelevanten Kontaminationen gibt Dowhanick (*Cerevisia*, 1995, 20/4, S. 40-49).

Die Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR; Mullis et al., siehe US 4 683 195, US 4 683 202, US 4 965 188) ist eine schnelle und effektive Methode, Keime spezifisch nachzuweisen. Es sind eine Reihe von Nukleinsäuremolekülen bekannt, durch deren Verwendung als Primer und/oder Sonden der spezifische Nachweis von brauereirelevanten Mikroorganismen möglich ist. Nachteilig ist jedoch, daß bei Einsatz dieser Nukleinsäuremoleküle in einer Amplifikations- bzw. Detektionsreaktion immer nur ein Bruchteil aller möglichen brauereirelevanten Mikroorganismen nachgewiesen werden kann. Diese PCR Systeme dienen zum spezifischen Nachweis jeweils nur einzelner Spezies in einer Amplifikationsreaktion der Gattungen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* und *Megasphaera* (Sakamoto US 5 869 642, Nietupski et al. US 5 705 339, US 5 484 909, Tschiuchia et al. JP06141899A, JP06113888A / ASBC J., 1992, S. 64-67 / ASBC J. 1993, S. 40-41, Yasui JP07289295A / Can. J. Microbiol., 1997 43, S. 157-163,

Shimada et al. JP06090793, Alatossava et al. WO97/09448, Doyle et al., *J. of Ind. Microbiology*, 1995, 15, S. 67-70, DiMichele et al. ASBC J., 1993, S. 63-66; Vogeser et al., *Brauwelt*, 1998, 24/25, S. 1060-1063). Ferner sind die beschriebenen Verfahren zur Visualisierung der entstandenen Amplifikate, wie etwa die Agarosegelektrophorese, problematisch, da das cancerogene und hochgiftige Ethidiumbromid zur Anfärbung der Amplifikate verwendet wird. Diese Verfahren sind nur schwer automatisierbar und die Auswertung der Agarosegele bzw. die Identifizierung der Keime anhand der Amplifikatgrößen ist z.T. nicht eindeutig.

Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren sowie Mittel anzugeben, die ein Schnelltest auf Kontamination von Bier und Brauereirohstoffen durch Mikroorganismen ermöglichen, wobei der Test den Nachweis der gesamten Bandbreite an möglichen bierkontaminierenden Mikroorganismen erfassen soll.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuremolekülen (Primern), die mit einem in brauereirelevanten Mikroorganismen konservierten Bereich einer mikrobiellen Nukleinsäure hybridisieren;
- (b) Amplifizieren der mikrobiellen Nukleinsäure oder eines Teils derselben zur Erzeugung von mindestens einem Amplifikationsfragment;
- (c) Inkontaktbringen der in Schritt (b) erhaltenen Amplifikationsfragmente mit mindestens einem zweiten Nukleinsäuremolekül (Sonde), welches mit mindestens einem Amplifikationsfragment spezifisch hybridisiert, das eine für sämtliche brauereirelevanten Mikroorganismen oder für eine oder mehrere Familien, Gattungen oder Arten von brauereirelevanten Mikroorganismen spezifische Sequenz der mikrobiellen Nukleinsäure umfaßt;
- (d) Nachweis von mindestens einer Hybridnukleinsäure, die aus einem Amplifikationsfragment und einem im Schritt (c) eingebrachten zweiten Nukleinsäure-

molekül besteht,

sowie durch ein Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus:

- (i) einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 1-107 oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotide langes Fragment derselben;
- (ii) einer Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure nach (i) spezifisch hybridisiert;
- (iii) einer Nukleinsäure, die mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 90% identisch mit einer Nukleinsäure nach (i) oder (ii) ist, oder
- (iv) einer Nukleinsäure, die komplementär zu einer Nukleinsäure nach (i) bis (iii) ist.

In den Sequenzen nach SEQ ID NO 1-107 werden Nukleotide folgendermaßen abgekürzt: G = Guanosin, A = Adenosin, T = Thymidin, C = Cytidin, U = Uracil, i = Inosin.

Nach IUPAC werden Mischungen wie folgt abgekürzt: R = G oder A, Y = C oder T, K = G oder T, W = A oder T, S = C oder G, M = A oder C, B = C, G oder T, D = A, G oder T, H = A, C oder T, V = A, C oder G, N = A, C, G oder T.

Zur Bestimmung der Identität (im Sinne von vollständiger Übereinstimmung, entsprechend 100 % Identität) bei Nukleinsäure-Sequenzen nach (iii) werden Teilsequenzen eines größeren Polynukleotids betrachtet. Diese Teilsequenzen umfassen 10 Nukleotide und sind dann identisch, wenn alle 10 Bausteine bei zwei Vergleichssequenzen identisch sind. Die Nukleotide Thymidin und Uridin sind als identisch anzusehen. Als Teilsequenzen können alle möglichen Fragmente eines größeren Polynukleotids betrachtet werden.

Dabei liegt 90 % Identität vor, wenn in den beiden zu vergleichenden Sequenzen in einem Abschnitt 9 von 10 Nukleotide bzw. 18 von 20 Nukleotide identisch sind.

Als Beispiel seien zwei Polynukleotide betrachtet, die 20 Nukleotide umfassen und sich in dem 5. Baustein unterscheiden. In einem Sequenzvergleich findet man dann sechs 10-er Nukleotide, die identisch sind und 5, die nicht identisch sind, da sie sich in einem

Baustein unterscheiden.

Außerdem kann die Identität graduell bestimmt werden, wobei die Einheit in Prozent angegeben wird. Zur Bestimmung des Grades der Identität werden auch Teilsequenzen betrachtet, die minimal die Länge der tatsächlich genutzten Sequenz, z.B. als Primer, oder aber 20 Nukleotide umfassen.

Als Beispiel werden Polynukleotide A mit einer Länge von 100 Nukleotiden und B mit einer Länge von 200 Nukleotiden verglichen. Aus Polynukleotid B wird ein Primer abgeleitet mit einer Länge von 14 Nukleotiden. Zur Bestimmung des Grades der Identität wird Polynukleotid A mit dem Primer in seiner ganzen Länge verglichen. Wenn die Sequenz des Primers in Polynukleotid A vorkommt, wobei sie aber in einem Baustein abweicht, dann gibt es ein Fragment mit einem Identitätsgrad von 13:14 → 92,3 %.

Im zweiten Beispiel werden die zuvor genannten Polynukleotide A und B in ihrer Gesamtheit verglichen. In diesem Fall werden alle möglichen Vergleichsfenster einer Länge von 20 Nukleotiden angelegt und für sie der Identitätsgrad bestimmt. Sind also Nukleotid Nr. 50-69 von Polynukleotid A und B mit Ausnahme von Nukleotid Nr. 55 identisch, dann ergibt sich für diese Fragmente ein Identitätsgrad von 19:20 → 95 %.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist schneller als bisherige mikrobiologische Nachweisverfahren durchführbar und erlaubt, mehrere, vorzugsweise sämtliche potentiell in einer Probe vorhandenen brauereirelevanten Mikroorganismen nachzuweisen, wie z.B. auch selten als Kontaminante auftretende *Lactobacillus*-Spezies oder *Selenomonas*- bzw. *Zymophilus*-Vertreter, für die bislang kein Nachweisverfahren existierte. Der Nachweis ist umfassend und zeigt alle Kontaminationsgefahren in der Brauerei an. Mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens können brauereirelevante Mikroorganismen sowohl in Bierproben als auch in Rohstoffproben (Gerstenmalz, Hefe, Hopfen, Wasser) oder Proben von Zwischenprodukten in der Bierherstellung (z.B. Maische, Würze) nachgewiesen werden, und zwar auch wenn die Anzahl der kontaminierenden Mikroorganismen noch gering ist.

Als brauereirelevante Mikroorganismen werden in diesem Zusammenhang in erster Linie

Bakterien und insbesondere die oben beschriebenen Bakterien *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingiensis*, *Pectinatus* sp. DSM 20764, *Megasphaera cerevisiae*, *Selenomonas lacticifex*, *Zymophilus paucivorans* und *Zymophilus raffinosivorans* verstanden, sowie auch alle in Bier auffindbaren Mikroorganismen, die zwar nicht zu den vorgenannten Spezies gehören, dennoch sich in Bier vermehren können, beispielsweise seltene Vertreter der Familie der *Lactobacillaceae* wie *Lactobacillus malefermentans*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* und *Lactococcus lactis*.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren nachweisbaren Mikroorganismen sind also nicht auf die bisher als Bierkontaminanten beschriebenen Mikroorganismen beschränkt. Vielmehr bietet der Einsatz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle und Verfahren die Möglichkeit, das Vorhandensein von anderen brauereirelevanten Mikroorganismen zu erkennen, die bisher nicht als Bierkontaminanten beschrieben wurden. Ein positives Ergebnis auf der Ebene höherer taxonomischer Einheiten (z.B. Ordnungen, Familien, Gattungen) verbunden mit einem negativen Ergebnis auf der Ebene der bekanntesten brauereirelevanten niederen taxonomischen Einheiten (z.B. Spezies, Subspezies, Stämmen) zeigt eine Kontamination mit einem solchen untypischen brauereirelevanten Mikroorganismus an.

In einem ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die zu untersuchende Probe mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuremolekülen (Primern) in Kontakt gebracht. Diese Nukleinsäuremoleküle hybridisieren mit einem Bereich einer mikrobiellen Nukleinsäure, der in brauereirelevanten Mikroorganismen konserviert ist. Die Hybridisierung erfolgt durch Paarung der Primer mit Bereichen der mikrobiellen Nukleinsäure, die eine zumindest teilweise komplementäre Basensequenz aufweisen. Durch den Begriff "konserviert" wird die evolutionäre Variabilität von Nukleotidsequenzen für Spezies verschiedener taxonomischer Einheiten charakterisiert. Vergleicht man sich entsprechende Sequenzabschnitte von mindestens zwei beliebigen brauereirelevanten

Mikroorganismen, so kann die Sequenz als variabel oder als konserviert angesehen werden. Als konserviert werden solche Vergleichsequenzen bezeichnet, die zu mindestens 95%, als variabel solche die weniger als 95% identisch sind. Ein in brauereirelevanten Mikroorganismen konservierter Bereich einer Nukleinsäure bezeichnet also einen Bereich, der in allen brauereirelevanten Mikroorganismen (wie oben definiert) zu mindestens 95% identisch ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kommt der konservierte Bereich in einem Genomabschnitt vor, der die bakteriellen 23S- und 5S-Gene enthält. Dieser Bereich umfaßt den intergenischen Spacer zwischen den Genen für die 23S-rRNA und die 5S-rRNA sowie die angrenzenden 23S- und 5S-rDNA-Gene und schließt sowohl konservierte Sequenzbereiche als auch hypervariable (d.h. sehr keimspezifische) Sequenzbereiche ein. Prokaryontische Ribosomen beinhalten in der Regel drei distinkte Nukleinsäurekomponenten, welche allgemein als 5S, 16S und 23S rRNA (ribosomale Nukleinsäure) bekannt sind. Die genetische Information für diese Ribonukleinsäuren (rDNA) ist im Genom typischerweise als Tandem angeordnet. Die typische Organisation einer solchen Einheit ist 16S-23S-5S, wobei die Gene über kurze hypervariable intergenische Bereiche; sogenannte Spacers, miteinander verbunden sind. Die Einheiten sind im Genom mehrfach vorhanden, wobei die Anzahl der Operons von Art zu Art variiieren kann. Die hohe Konservierung der DNA-Sequenz in bestimmten Abschnitten der ribosomalen DNA über das gesamte Bakterienreich ermöglicht ein Design von nicht spezifischen Oligonukleotiden auch ohne genaue Kenntnis der einzelnen DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Organismen. Die erfindungsgemäßigen Sequenzen nach SEQ ID NO 1-20 (Tabelle 1) stellen Sequenzen des 23S-5S intergenischen Spacers von brauereirelevanten Mikroorganismen dar, von denen Nukleinsäuremoleküle zum Einsatz in das erfindungsgemäße Verfahren abgeleitet werden können.

Die im ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuremolekülen wird so gewählt, daß sie als Primer in einer Amplifikationsreaktion einsetzbar sind, d.h. ein Nukleinsäuremolekül hybridisiert an einen ersten konservierten Bereich des ersten Stranges der Ziel-DNA und das andere Nukleinsäuremolekül an einen zweiten konservierten Bereich des zum ersten komplementären DNA-Stranges, wobei der gewünschte Zielbereich der DNA eingeschlossen

wird. Beide Nukleinsäuremoleküle weisen eine Länge von mindestens 10 bp, vorzugsweise 15-30 bp auf. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Kombination aus mindestens zwei Nukleinsäuremolekülen gemäß dieser Erfindung eingesetzt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Kombination eingesetzt, die mindestens ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 40 bis 47 (Tabelle 2) und mindestens ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 48-54 oder SEQ ID NO 55-59 oder SEQ ID NO 60-72 (Tabelle 2) umfaßt.

In einem zweiten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die mikrobielle Nukleinsäure oder ein Teil derselben amplifiziert, wodurch mindestens ein Amplifikationsfragment erzeugt wird. Unter Amplifikation wird die Erhöhung der Konzentration einer in einem Reaktionsgemisch vorliegenden Nukleinsäure oder eines Teils derselben verstanden. Eingesetzte Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren sind z.B. die PCR (US 4 683 195, US 4 683 202, US 4 965 188), die "self-sustained sequence replication" (EP 329 822), das "transcription based amplification system" (EP 310 229) und das "β-RNA-Replicase-System" (US 4 957 858). In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfaßt das Amplifizieren eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt das Amplifizieren eine Ligasen-Kettenreaktion oder eine isotherme Nukleinsäureamplifikation.

In einem dritten Schritt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung werden die erhaltenen Amplifikationsfragmente mit mindestens einem zweiten Nukleinsäuremolekül (Sonde) in Kontakt gebracht. Dieses Nukleinsäuremolekül bzw. diese Nukleinsäuremoleküle hybridisieren spezifisch mit mindestens einem Amplifikationsfragment, das eine Sequenz der mikrobiellen Nukleinsäure umfaßt, die für sämtliche brauereirelevanten Mikroorganismen oder für eine oder mehrere Familien, Gattungen oder Arten von brauereirelevanten Mikroorganismen spezifisch ist, d.h. nur in Mitgliedern dieser Familien oder Gattungen bzw. in diesen Arten vorkommt.

Als Hybridisierung wird die Doppelstrangbildung zweier identischer oder ähnlicher Nukleotidfragmente (DNA, RNA, PNA) bezeichnet. Von spezifischer Hybridisierung spricht man, wenn eine stabile Hybridnukleinsäure zwischen dem Oligonukleotid und der ent-

sprechenden Ziel-DNA des Oligonukleotides besteht, nicht jedoch zu anderer DNA als der Ziel-DNA. Im Sinne dieser Erfindung weist das Merkmal "Sequenz, die mit einer Sequenz nach (i) spezifisch hybridisiert" auf eine Sequenz hin, die unter stringenten Bedingungen mit der Sequenz nach (i) hybridisiert. Beispielsweise können die Hybridisierungen bei 50°C mit einer Hybridisierungslösung bestehend aus 2,5 x SSC, 2 x Denhardts Lösung, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,5 durchgeführt werden. Als Waschbedingungen eignen sich z.B. viermal wiederholte 1minütige Waschungen in 0,1 x SSC bis 1,0 x SSC, 2 x Denhardts, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6 bei 20-50°C.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird als zweites Nukleinsäuremolekül (Sonde) ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle eingesetzt. Als Consensus-Sonde wird ein Nukleinsäuremolekül verstanden, das mit hochkonservierten Bereichen einer mikrobiellen Nukleinsäure hybridisiert und mit den Amplifikaten sämtlicher brauereirelevanter Mikroorganismen reagiert. Erfindungsgemäße, als Consensus-Sonden verwendbare Nukleinsäuremoleküle weisen eine Sequenz nach einer der SEQ ID NO 40 bis 72 (Tabelle 2) auf.

Zum Nachweis einer spezifischen Gattung von brauereirelevanten Mikroorganismen wird als zweites Nukleinsäuremolekül vorzugsweise ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 35 bis 39 oder SEQ ID NO 104 bis 107 (Tabelle 2) eingesetzt. Die Gattungsspezifität einer Sonde ist definiert als die Fähigkeit dieser Sonde, mit der DNA aller Isolate einer möglichst großen Gruppe von Vertretern der jeweiligen nachzuweisenden Gattung zu hybridisieren.

Als speziesspezifische Nukleinsäuresonden werden Nukleinsäuremoleküle verstanden, die mit der DNA von allen Isolaten der jeweiligen nachzuweisenden Spezies unter denselben Stringenzbedingungen hybridisieren. Erfindungsgemäße speziesspezifische Nukleinsäuremoleküle mit den SEQ ID NO 21-22, SEQ ID NO 25-34, SEQ ID NO 73-78, SEQ ID NO 80-85 oder SEQ ID NO 87-97 (Tabelle 2) können eingesetzt werden.

Spezialfälle stellen die Sonden SEQ ID 23-24, SEQ ID NO 79, SEQ ID NO 86 und SEQ ID NO 98 bis 103 dar. Mit den Sonden nach SEQ ID NO 23 und SEQ ID NO 79 können Stämme von *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* nachge-

wiesen werden. Eine Sonde nach SEQ ID NO 24 erlaubt den Nachweis von zwei Subspezies von *Lactobacillus coryniformis* (*L. coryniformis* ssp. *coryniformis* und *L. coryniformis* ssp. *torquens*). Mit der Sonde SEQ ID 86 können Stämme der Arten *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus* und *Pediococcus parvulus* nachgewiesen werden. Bei der Verwendung dieser Sonden werden andere brauereirelevanten Mikroorganismen nicht erfasst. Ebenso werden mit den Sonden SEQ ID NO 98 bis 103 alle nachzuweisenden brauereirelevanten Spezies der Familie der *Lactobacillaceae* erfasst, andere brauereirelevanten Spezies und Gattungen werden diskriminiert.

Im letzten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt der Nachweis von mindestens einer Hybridnukleinsäure, die aus einem Amplifikationsfragment und einem im vorangegangenen Schritt eingebrachten zweiten Nukleinsäuremolekül besteht.

Vorzugsweise sind erste Nukleinsäuremoleküle (Primer) und/oder zweite Nukleinsäuremoleküle (Sonde) mindestens 10 Nukleotide, vorzugsweise 15-30 Nukleotide lang. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die ersten und/oder die zweiten Nukleinsäuremoleküle dadurch modifiziert, daß bis zu 20% der Nukleotide in 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide aus einem 10er-Block durch Nukleotide ersetzt sind, die in Bakterien nicht natürlich vorkommen.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt vorzugsweise die sogenannte Consensus-PCR. Bei dieser Methode erfolgt eine Vervielfältigung der mikrobiellen Nukleinsäure oder eines Teils derselben und eine anschließende Detektion dieser Moleküle mittels Hybridisierung mit markierten spezifischen Sonden. In der Consensus-PCR werden Nukleinsäuremoleküle eingesetzt, die es ermöglichen, von mehreren oder gar allen der relevanten Stämme, Subspezies, Spezies oder Gattungen ein Amplifikationsprodukt zu erhalten. Die Amplifikationsreaktion führt nicht zu einer Differenzierung der Mikroorganismen. Die Spezifität des Nachweises wird durch die anschließende Hybridisierungsreaktion mit spezifischen Sonden erreicht. Auf diese Art und Weise können brauereirelevante Mikroorganismen simultan in einer einfachen Kombination aus Amplifikations- und Detektionsreaktion erfaßt werden.

Diese Art der Amplifikation und Detektion ermöglicht die Automatisierbarkeit der Detektionsreaktion, so daß ein hoher Probendurchsatz ermöglicht wird. Es kann beispielsweise ein PCR-ELISA-Nachweisverfahren eingesetzt werden, bei dem die entsprechenden Sonden in verschiedene Kavitäten einer Mikrotiterplatte gebunden werden, in denen anschließend die Hybridisierung und der Nachweis der markierten Amplifikate geschieht. Der Nachweis kann auch durch die Verwendung eines Microarrays erfolgen, auf dem mehrere Sonden immobilisiert sind, wodurch die Nachweisreaktion schnell und ohne großen Aufwand durchgeführt werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das zweite Nukleinsäuremolekül (Sonde) so modifiziert bzw. markiert, daß es ein nachweisbares Signal erzeugen kann. Die Modifikation bzw. Markierung wird ausgewählt aus (i) radioaktiven Gruppen (ii) farbigen Gruppen, (iii) fluoreszierenden Gruppen, (iv) Gruppen zur Immobilisierung an einer festen Phase und (v) Gruppen, die eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen erlauben.

Als Markierung werden im Sinne dieser Erfindung direkt oder indirekt nachweisbare Gruppen oder Gruppen zur Immobilisierung an eine feste Phase bezeichnet, die an das Nukleinsäuremolekül angehängt sind. Direkt nachweisbar sind Metallatome, radioaktive, farbige oder fluoreszierende Gruppen. Indirekt nachweisbar sind immunologisch oder enzymatisch nachweisbare Gruppen, wie z.B. Antigene und Antikörper, Haptene oder Enzyme oder enzymatisch wirkende Teile von Enzymen. Diese indirekten Gruppen werden in nachfolgenden Reaktionen nachgewiesen. Bevorzugt sind Haptene, die an ein Oligonukleotid gekoppelt sind und die man in einer anschließenden Antikörperreaktion nachweist.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von brauereirelevanten Bakterien verwendet werden. Verwendung können die hier beschriebenen Primer und/oder Sonden auch bei der Detektion der beschriebenen Keime in anderen Getränken als Bier, in anderen Proben aus dem Brauereibereich, wie z.B. in Rohstoffen, Anstellhefe, Umgebungsproben, in anderen Lebensmittelproben oder in klinischen Proben etc. finden.

Beispiele:

Beispiel 1: Bestimmung der DNA-Zielsequenz der bierschädlichen Bakterien und nahverwandter Arten

Durch Sequenzvergleich bekannter 23S-rDNA und 5S-rDNA Sequenzen (GenBank Sequence Database des National Center of Biotechnology Information: NCBI) wurden konservierte Genbereiche ermittelt, die als Hybridisierungsorte der zur Sequenzierung verwendeten Primer dienen. Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde durch an sich bekannten Standardverfahren genomische DNA isoliert. Mit Primern, die in hochkonservierten Bereichen hybridisieren, wurden in einer PCR von allen nachzuweisenden Bakterien Amplifikate erhalten. Folgende Primer wurden für die Amplifikation und die anschließende Sequenzierung verwendet:

Primer 1 = SEQ ID NO 47:

5'-AAG TGC TGA AAG CAT CTA AG-3'

Primer 2 = SEQ ID NO 55:

5'-GGC RRY GTC TAY TYT CSC-3'

Zusammensetzung der PCR:

Genomische DNA (10-100 ng)	1,00 µl	
H ₂ O	16,85 µl	
Puffer (10 x)	2,50 µl	1 x
dNTP (10 mM)	0,50 µl	200 µM
Primer 1=Seq ID NO 48 (5 µM)	1,50 µl	0,30 µM
Primer 2=Seq ID NO 49 (5 µM)	1,50 µl	0,30 µM
MgCl ₂ (50 mM)	1,00 µl	2,00 mM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl	0,03 U/µl
Σ	25,00 µl	

Temperaturprofil:

5'	95°C	
30"	95°C	
30"	50°C	x38
30"	72°C	
5'	72°C	

Diese Amplifikate wurden über ein Agarosegel und durch eine anschließende Behandlung mit dem QIAquick PCR Gel Extraction Kit (Fa.Qiagen) gereinigt und mit den o.g. Primern, die mit einer IRD-800 Markierung versehen sind, in dem Long Read Sequencer Modell 4000L (Fa.LI-COR) sequenziert. Die resultierenden Sequenzen der 23S/5S-rDNA-Spacerbereiche der brauereirelevanten Bakterien und der phylogenetisch nah verwandten Arten wurden miteinander verglichen und Sequenzbereiche bestimmt, die

- 1.) in allen Spezies der jeweiligen nachzuweisenden Gattung zu finden sind und sich gleichzeitig von denen anderer Gattungen bzw. Spezies unterscheiden.
- 2.) nur in der jeweiligen zu bestimmenden Spezies zu finden sind, sich jedoch von anderen zu erfassenden und nicht zu erfassenden Bakterien unterscheiden.

In den unter 1.) beschriebenen Sequenzbereichen wurden Hybridisierungsstellen gattungsspezifischer Oligonukleotide, in den unter 2.) beschriebenen Sequenzbereichen die Bindungsstellen speziespezifischer Oligonukleotide definiert.

Beispiel 2: Nachweis von bierschädlichen Bakterien mit der Polymerase-Kettenreaktion**I. Amplifikation**

Aus Reinkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Bakterien wurde in an sich bekannten Standardverfahren genomische DNA isoliert. Dekadische Verdünnungen von 1 fg/ μ l bis 1 pg/ μ l dieser Präparationen wurden anschließend in eine PCR mit folgender Zusammensetzung eingesetzt:

Primer 3 = SEQ ID NO 46:

5'-AAG GGC CAT CRC TCA ACG G -3'

Primer 4 = SEQ ID NO 48:

5'-TGT GTT CGI iAT GGG AAC AGG TG -3'

Genomische DNA	1,00 µl	4,00 µl	
H ₂ O	16,60 µl	66,40 µl	
Puffer (10x)	2,50 µl	10,00 µl	1x
dNTP (10 mM)	0,50 µl	2,00 µl	0,20 mM
Primer 3= SEQ ID NO 21 (5 µM)	1,50 µl	6,00 µl	0,30 mM
Primer 4= SEQ ID NO 22 (5 µM)	1,50 µl	6,00 µl	0,30 mM
Digoxigenin markiert			
DMSO (100%)	0,25 µl	1,00 µl	1,00 %
MgCl ₂ (50 mM)	1,00 µl	4,00 µl	2,00 mM
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,15 µl	0,60 µl	0,03 U/µl
Σ	25,00 µl	100,00 µl	

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen in dem Mastercycler® gradient (Fa.EPPENDORF) nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

5'	95°C	
30"	95°C	
45"	55°C	x38
90"	72°C	
5'	72°C	

Primer 3 (SEQ ID NO 46) wurde durch Sequenzvergleich bekannter 23S-rDNA Sequenzen (GenBank Sequence Database des NCBI) bestimmt. Er hybridisiert an hochkonserve Sequenzabschnitte im 23S-rDNA Genbereich. Der Bindungsort liegt außerhalb des mit den Primern SEQ ID NO 48, 49 sequenzierten Bereiches.

Primer 4 (SEQ ID NO 48) wurde aufgrund eigener Sequenzdaten bestimmt. Der Hybridisierungsort von Primer 2 liegt angrenzend an dem intergenischen 23S/5S-Spacer im 5S-rRNA Genbereich.

II. Detektion im PCR-ELISA

Die Detektion erfolgt im PCR-ELISA. Dazu werden je verwendeter Sonde 5 µl Amplifikat mit 5 µl Denaturierungspuffer (125 mM NaOH, 20 mM EDTA, pH 14) versetzt und 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 2 pmol der jeweiligen biotinylierten Sonde werden in 100 µl Hybridisierungspuffer (2,5xSSC, 2x Denhardts Lösung, 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,5) pipettiert und in die Kavitäten einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte überführt und bei der Hybridisierungstemperatur von 50°C vorinkubiert. Nach der Denaturierung wird der Denaturierungsansatz zu dem Hybridisierungsansatz pipettiert. Anschließend erfolgt die 30 minütige Inkubation bei Hybridisierungstemperatur. Ist die Hybridisierung abgeschlossen, wird der Hybridisierungsansatz entfernt und 4x mit 200 µl Waschpuffer 1 (WP1: 0,1 x SSC, 2 x Denhardts, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6) jeweils für 1 min. bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Anschließend werden 100 µl einer nach Herstellerangaben verdünnten Lösung eines mit einer Meerrettichperoxidase konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers zugegeben (Boehringer Mannheim). Das Konjugat wird in Waschpuffer 2 (WP2: 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,5% Blocking-Reagenz, 100 µg/ml Heringssperma, pH 7,6) verdünnt. Anschließend erfolgt die Antikörper-Inkubation bei 37°C für 30 min.. Danach wird viermal mit 200 µl WP 2 gewaschen (bei Raumtemperatur). Nach dem Waschen werden 100 µl POD-Substrat (Boehringer Mannheim) zugegeben und 20 min. bei RT inkubiert. Anschließend wird die Farbreaktion mit 100 µl 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt und bei 450 nm gemessen.

III. Auswertung

Gemäß dem oben aufgeführten Detektionsprotokoll wurde der Nachweis für alle untersuchten Bakterien und Bakteriengruppen unter Verwendung der entsprechenden gattungs- und speziesspezifischen Sonden geführt. Gattungsspezifische Sonden sind für *Pediococcus* SEQ ID NO 35, für *Pectinatus* SEQ ID NO 36, für *Megasphaera* SEQ ID

NO 37, für *Selenomonas* SEQ ID NO 38, für *Zymophilus* SEQ ID NO 39. Speziesspezifische Sonden sind für *Lactobacillus brevis* SEQ ID NO 21, *Lactobacillus lindneri* SEQ ID NO 22, *Lactobacillus casei* + *Lactobacillus paracasei* SEQ ID NO 23, *Lactobacillus coryniformis* SEQ ID NO 24, *Lactobacillus curvatus* SEQ ID NO 25, *Pediococcus damnosus* SEQ ID NO 26, *Pediococcus inopinatus* SEQ ID NO 27, *Pectinatus cerevisiiphilus* SEQ ID NO 28, *Pectinatus frisingiensis* SEQ ID NO 29, *Pectinatus* sp. DSM20764 SEQ ID NO 30, *Megasphaera cerevisiae* SEQ ID NO 31, *Selenomonas lacticifex* SEQ ID NO 32, *Zymophilus paucivorans* SEQ ID NO 33 und *Zymophilus raffinosivorans* SEQ ID NO 34.

Als Kontrolle wurden die Consensus-Sonden SEQ ID NO 40 und 41 eingesetzt, die an die Amplifikate sämtlicher nachzuweisender Spezies hybridisieren. Weitere mögliche Bindungsstellen für Consensus-Sonden sind SEQ ID NO 42-45. Die Sonden der SEQ ID NO 40 bis 45 sind durch Sequenzvergleich bekannter 23S-rDNA und 5S-rDNA Sequenzen (GenBank Sequence Database, NCBI) ermittelt worden.

War die gemessene Extinktion bei einer eingesetzten Menge genomischer DNA von 10 fg in die PCR größer als 1, so wurde das Ergebnis positiv bewertet. Die Ergebnisse des PCR-ELISA sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 1

SEQ ID NO	Herkunft		Beschreibung	Sequenz
	Genus	Spezies		
1	Lactobacillus	brevis	DSM 20054	23S-spacer-5S 5`- TATATGGAG TAAGACCCCT GAGGAGATGAT CAGGTAGATA GGCTGGAAAGT 50 AGCAGGCCG TGAGGGTGG AGCGGACCAG TACTATCGG TCGAGGACTT 100 ANCCAAGTC ACAAACGTAGT TTGAGGGAA GAAGTTCTCT ATAAATTGAAT ATATATCTAGT 150 CACCTGTTCC CATGCCGAAC ACAGAAAGTTA AGCTTCAGCA CGCCGATACT 200 AGTTGGGGGA TCGCCCC-3` 250
2	Lactobacillus	lindneri	DSM 20690	23S-spacer-5S 5`- CCATTCCCTAT ATGGAGTAA GACTCCTGAA AGATGATCAG GTCGATAGGT 50 TAGAAAGTGG AGCATAGTGA TAGTGAAAGC GGACTATAC TAATCAGTCG 100 AGGACTTAAC CAAGGAAGAC ACAGGGTTAA ATCAAAGTTG AACAGAGAAAG 150 ATATTATCA GTTTTGAGAG AACGAAAGTTAC GCTCAGGCTT ATGAAAAATA 200 AGCATATAGTT GGTGGCGATA GCCTGAAGGA TACACCTGTT CCATGCCGA 250 ACACAGAAAGT TAAGCTCTAG CACGCCAAA GTAGTGGGG GATGCCCCC 300 TGCGAGGATA GGACGATGGT CATAGC-3` 300
3	Lactobacillus	casei	DSM 20011	23S-spacer-5S 5`- CCATTCCCTAT ATGGAGTAA GACCCCTGAG AGATGATCAG GTAGATAGGC 50 TGGAAAGTGG AGTGCAGCGA TGCAATGGAGC GGACCACTAC TAATCGGTGC 100 AGGACTTAAC CAAAGTAGGC GTGAGCAGGA GGCCTTAGAA ACCGGAGCAT 150 AAGCGGGCCT GAGTTCTGTT GCGGGGTTT GGCCAATGGG TTCAAGGGTTTC 200 TTATGTGGAG GTTCTGCGA CTGGCGAACGC GTTTCGATGA ATATACATGG 250 TTCCCGACAA CACAAAACA ACAATGATAG CCAGTTTGA GAGCGCAAAG 300 TTCTCATAAAG TGTGGTGGCG ATAGCAAGAA GGATAACACT GTTCCCATGC 350 C-3` 350
	Lactobacillus	paracasei	DSM 20008 ssp. paracasei	23S-spacer-5S 5`- CCATTCCCTAT ATGGAGTAA GACCCCTGAG AGATGATCAG GTAGATAGGC 50 TGGAAAGTGG AGTGCAGCGA TGCAATGGAGC GGACCACTAC TAATCGGTGC 100 AGGACTTAAC CAAAGTAAGAG TGTGAGCAGG AGGGTTAGA AACCGGGAGCA 150 TAAGCGGGCC TGAGCGGTGAT GGCGGGGCTT TGCCCATTCG AGGGTTAGA AACCGGGAGCA 200 CTTATGTGCA GTTCTGCG ACTGGCGAACCA CGTTTCGATG ACAAGTACGT 250 TAAGTTCAAG GCAGCAATTAA AACAAATGATA GCTAGTTTG AGAGCGCAAAG 300 GTTCTCATAA GTGTGGTGGC GATAAGCAAGA AGGATAACCC TGTCCCCATGC 350 CCGAAACACAG AAGTTAAGCT TCTTCACGCC GAGAGTAGTT GGTTGGAAAC 400 TGCTCTGGGAG GATA-3` 400

SEQ ID NO	Herkunft	Beschreibung	Sequenz
5	Lactobacillus paracasei ssp. paracasei	DSM 20008 23S-spacer-5S Operon 2	5`- CATTCCAT ATGGAAGTAA GACCCCTGAG AGATGATCAG GTAGATAGGC 50 TGGAAAGTGGAA AGTGCAGCGA TGCATGGGC GGACCAAGTAC TAATCGGTG 100 AGGACTTAAC CAAGTAAGCG TGCAAGCAGG AGCAGGTTTC TGGCACTCG 150 AACACATTTC GATGACAAGT ACGTTAAGTT CAAGGCAGCA ATTAAACGAT 200 GATAGCCAGT TTGAGAGGCG CAAAGTCTC ATAAGTGTGG TGGCGATAGC 250 AGAAGGATA CACCTGTCC CATGCCGAAC ACAGAAGTAA AGCTTCTTCA 300 CGCCGAGAGT AGTTGCTGGG AAACTGCCCCG CGAGGATA- 3`
6	Lactobacillus coryniformis ssp. coryniformis	DSM 20001	5`- CTGAGGTTGA GATTCCCAT TCTTTATGG AAGTAAGACC CCTGAGAGAT 50 GATCAGGTAG ATAGGTTGGA ATGGGACGTT CGGTGAGGCA TGGAGCGGAC 100 CAATACTAACT CGGTGAGGA CTTAACCAAAG TAGCATGTAC GTAGTGTAG 150 TTAAAGGCA AAGAAATGAA TATCCAGTT TGAGAGGCGA ACGTTCCTCAG 200 AAAGTGGTGT GGGGCGATA GCAAGAAGGA TACACCTGTT CCCATGTGCA 250 ACACAGAAGT TAAGCTCTT AGGCCGAGA GTAGTGGGG GAGCACCCCC 300 TGCGAGGATA GGACGAT- 3`
7	Lactobacillus coryniformis ssp. torquens	DSM 20004	5`- CTGAGGATGA GATTCCCAT TCTTTATGG AAGTAAGACC CCTGAGAGAT 50 GATCAGGTAG ATAGGTTGGA ATGGGACGTT CGGTGAGGCA TGGAGCGGAC 100 CAATACTAACT CGGTGAGGA CTTAACCAAAG TAGCATGTAC GTAGTGTAG 150 TTAAAGGCA AAGAAATGAA TATCCAGTT TGAGAGGCGA ACGTTCCTCAG 200 AAAGTGGTGT GGGGCGATA GCAAGAAGGA TACACCTGTT CCCATGTGCA 250 ACACAGAAGT TAAGCTCTT AGGCCGAGA GTAGTGGGG GAGCACCCCC 300 TGCGAGGATA GGACGAT- 3`
8	Lactobacillus curvatus	DSM 20019	5`- ACGCCTCGAG ATGAGATTTC CCATTCCTT ATGGAGTAA GACCCCTGAA 50 AGATGATCAG GTAGATAGGC TAGGAGTGGAA AGTACAGCGA TGTATGGAGC 100 GGACTAGTAC TAATCGGTG AGGACTTAAC CAAAGGTGCA ATGTTAGGCT 150 TTGAAATGA ATATTACTT ATTATGCACT TTGAGAGAA CGAAGTTCTT 200 CTCAGTGGCG AAGCACAAA TAGTGTGGTG GCGATAGCAA GAAGGATACA 250 CCGTGTTCCA TGTCGAACAC AGAAAGTTAAG CTTCTTAGGC CGGATAGTAG 300 TGGGGGAA ACTACCTGCG AGGATAGGAC GATGGT- 3`
9	Pediococcus damnosus	DSM 20331	5`- GATGAGATT CCCATCCAT TATGGAAGT AAGACCCCTG AGAGATGATC 50 ACGTAGATAG GTGGGAGTGC GAAGTGTAGT GATACTGGAA CGGGACCAAT 100 ACTAATCGGT CGAGGACTTA ACCACAAGT GGTGTTCTCA AGAGAAGGAT 150 TCGATATTAT TTGTTTGA GAGAATAAAAT TCCTTCACA CGAGCCGGCT 200 AAGTGGATCG GAGAAGTGTG GTGACGATAG TGAGAAGGAT ACACCTGTC 250 CCATGTCGAA CACAGAAGTT AAGCTTCTTA AGGCCGAGAG TAGTGGGGG 300 ATCGCTCCCT GCGGAGATAG GACGATGGTC AATAG- 3`

SEQ ID NO	Herkunft	Beschreibung	Sequenz
10	Pediococcus inopinatus	DSM 20285	23S-spacer-5S 5`- AGATGAGATT TCCCATTCCA TTATGGAA GAGAGATGAT CAGGTAGATA GGTTGGGAGT GGAAGTGTAG TGATACATGG AGCGGACCA 50 TACTAATCGG TCGAGGACTT AACCCACAAG TGGTGTTC TCA AAAGAGAACAA 100 TTTCGATAT ATTGAGTTT GAGAGAAATA ATTTCCTTCA CACGAGCCGC 150 GGAAAGTGGAT CGGAGAAGTG TGTTGACGAT AGTGAGAAGG ATACACCTGT 200 TCCCATGTCG AACACAGAAG TTAAAGCTTCA TAACGCCGAG AGTAGTGGG 250 GGATCGCTTC CTGCGAGGAT AGCACG - 3` 300
11	Pectinatus cerevisiiphilus	DSM 20467	23S-spacer-5S 5`- AAGTGGCTGAA AGCATCTTAAG CGTGAAACCT GCCTTAAGAT GAGGTTTCCC 50 AGAGCCGTA GGCTTGGAAAG GCACCTTGA TAAGACGGGG TAGATAGGCC 100 GGAGTAGAA GTACAGTAAAT GTACGAAGCG GACTGGTACT ATAAGCCGA 150 GAGCCTTAAC TAAAATCATC GAAAATAATG TTGGTCTGA GATTTCTCT 200 GTGAAAGTTT GAGTGTGCAA GACACTCTGG TTGAAGGGCA GGAAACGTGA 250 GAGCGTAAAAT CTGCGGACTT TGCTCAAAG AGTTAAAGCA TCTGGTGACG 300 ATACCTGGAT GGATCCACCT GTCCCCATTG CGAACACAGT AGTTAAAGCAT 350 CCACAGGGCTG AAGGTACTTG GGGGGGACCC CGCTGGGGAA ATAGGACACT 400 GCC - 3` 450
12	Pectinatus frisingensis	DSM 6306	23S-spacer-5S 5`- AAGTGGCTGAA AGCATCTTAAG CGTGAAACCA GCTTAAAGAT GAGGTTTCCC 50 AGAACGGCAAG TTTGGAAAGG ACCTTGAAGA AGACGAGGTA GATAGGCCGG 100 GAGTGGAAAGT ATGGTACAT ATGAAGGGAA CTGGTACTAA TAAGCCGAGA 150 GCTTAACCTTG ATTICATCAA AAAAGAGAAA TGTTTGGTCA GAGATTTCT 200 TCGTGAACT TTTGAGTGTG CAAGAACACT CGAGAGATA TAGTTAAAGG 250 AAAAGCAGCA GATAAGTTCTG CTGGTTACTG TATATACCGG CTGAGGTGCT 300 GAGGCACCTGA AGGCCAGAAC ATCTGGTGGC GATAACCTGGA TGATCCACC 350 TGTTCCCAATT CGAACACAG TAGTTAAGCA TCCACAGGCC GAAGGTACTT 400 GGGGGGCAGC CCCCTGCGAA AATAGGACAC CGCC - 3` 450

SEQ ID NO	Herkunft	Beschreibung	Sequenz
13	Pectinatus sp.	DSM 20764 Operon 1	5` - AAGTGTGTAAG AGCATCTAAG CGTAAACCT GCCTTAAGAT GAGGTTTCGGC 50 AGAGCCGTA GGCTTGGAAAG GCACCTTGAAT GATGACGAGG TAGATAGGCC 100 GGGAGTAGAA GTATGGTGCAC ATACGAAGCG GACTGGTACT ATAAGCCGA 150 GAGCTTAACCT TAATTCTATC TATAATGTT TGGTCTGTAT TTCTTCTGTG 200 AAGTTTGAG TGTGCAAGAT CACTCATGAA AGTATATAGG TAAAGGAAA 250 GCAGCAGATT AGTTCTGGT TACTCTATA TATGAGCACT AAGGTGCGAGA 300 AAAGAACGTT TGAGGAACG CGCGTTCGGT AAACCTACTT TGCCTGCTGA 350 TTATCTCAAT GCTAAAGCAT TAAGATAATT TTAGAGGAA CGCGCGTTCA 400 CTAGCGTTCA CTCTGGTAC TTATTCTTA AGTGGCTGAAAG CACTAAGAG 450 GGCAAGGAAA CGCGTGTTC GCGATGCTCA CTTTGCGTAC TTCATCTTA 500 GACTGCTAA GCAGTAAGAT CTGAAGCAGT ACCTGGATGG 550 ATCCACCTGT TCCCCATTCCG AACACAGTAG TTAAAGCATCC ACAGGGCGAA 600 GGTACTTGGG GGGCAGCCCC CTGGCGAGACT AGGACATGCC C - 3 `
14	Pectinatus sp.	DSM 20764 Operon 2	5` - AAGTGTGTAAG AGCATCTAAG CGTAAACCT GCCTTAAGAT GAGGTTTCGGC 50 AGAGCCGTA GGCTTGGAAAG GCACCTTGAAT GATGACGAGG TAGATAGGCC 100 GGGAGTAGAA GTATGGTGCAC ATACGAAGCG GACTGGTACT ATAAGCCGA 150 GAGCTTAACCT TAATTCTATC TATAATGTT TGGTCTGTAT TTCTTCTGTG 200 AAGTTTGAG TGTGCAAGAT CACTCATGAA AGTATATAGG TAAAGGGGAA 250 GCAGATTAGT TCCTGGTTA CTTTATATAT GAGGACTAAG GTGCAGAAAA 300 GAACGTTCA GGAAACCGGG CGTTCTGAGG CTCACTCTGC GTACTTCATC 350 TCTAGACTGC TAAAGCAGTA AGATCTGAAG CATCTGGTGG CGATACCTGG 400 ATGGATCCAC CTGTTCCAT TCCGAACACA GTAGTTAAGC ATCCACAGGC 450 CGAAGGTTACT TGGGGCCAG CCCCTGGCA AAGTAGGACA CGGCC - 3 `
	Megaphphaera cerevisiae	DSM 20462 Operon 1	5` - GCATCTAAGC GTGAAACCG CCTAGAGATG AGGTTCCTCA TTACGAAGT 50 AGATTAAGGTC CCATGAGAC GACATGGTAG ATAGGCCGG AGTGGACGTA 100 CAGTAATGTA TGGAGCCGAC CGGTACTAT AGACCCAGGA CTTGACTTAA 150 CGAGGGAAACC CATTITAAAG AAGCGAAGCG ACGCATAAAAA TGGAGTGTGAT 200 CGCTTATACC GAATCGCAGA TTGGTAAAG CAGCGGGAGAA TACCAATGCA 250 GGGGCAAACAC CAGTAAAGCAT AAACTAAGCG GATTCGGAGT GGGTGAGGA 300 GTTTCGTTAGC AGCGTAGGCT AACCCAACCA CGGCTTCGAA AGAAGGGCGAA 350 TGGTTGAA AAGACTACAT GGAAAGAAC GACGAAAGAC TCACAACCAA 400 ACATACAAA CTAAGTAGAT GACATTAGAG TCACCCGAT TGTTAAGATC 450 CGAAATACCTT TTGATGTAG TTGTCAGGAT ACGANTCCCTG AACGAAATC 500 AGTGGTGTAG GCTGCAGGGAA TCCACCTGTT CCCATACCGA ACACAG - 3 `

SEQ ID NO	Herkunft	Beschreibung	Sequenz
16	Megasphaera cerevisiae	DSM 23S-spacer-5S Operon 2 20462	<p>5' - GCATCTAACCGTGTGAAACCAAG CCTAGAGATG AGGTTCTCA TTACGAAGT 50</p> <p>AAGTAAGCTC CCATGAGAC GACATGGTAG ATAGGCCGG AGTGACGTA 100</p> <p>CAGTAATGTA TGGACGGAC CGGACTAAT AGACCGAGGA CTTGACTTAA 150</p> <p>GCAAAGAAC AATAAGAAGA ACCATGTAAGA TGTTGTAAGA GTTAGACGGG 200</p> <p>TAGTTAAGGT CGGAAATACT TTTCGATGTA GTTGTAGGA TAGAATCCCT 250</p> <p>GAAACGAAATT CAGTGGTGT GGCTGCAGGG ACCACCTGTT CCCATACCGA 300</p>
17	Selenomonas lacticifex	DSM 23S-spacer-5S Operon 1 20757	<p>5' - AAGTGTCTGAA AGCATCTAGG CGTGAAGCC GTCCCCGAGAT GAAGTATCTC 50</p> <p>ATGGGAGTAAT CCAGTAAGAT TCCTTGAAAGA AGACAAGGTA GATAGGTTGG 100</p> <p>GAGTGTAAAGC ATCGTAAGGT GTTCAGCGGA CCAATACTAA TAAATCGAGG 150</p> <p>GCTTAACCT ACAGACCTGT CCAAGAAGCG AAGGGGATTG GTAAACAGGT 200</p> <p>CGTATGCGAA AACATCCCA GAAATCGAGTC CGAATGGCGA AGATGATTGG 250</p> <p>CAGATGTTCA CCGCTAAATAA TCTAGAATGT TTGATACAA TTTTTCTCT 300</p> <p>GTATAGTTT GAGTGGACAT CGTTCAATTCA ATAATATCCA GTGACGATAG 350</p> <p>CTGAGTGGTA CCACCTGTT CCATACCGAA CACAGTAGTT AAGCACTCAT 400</p> <p>ACGCCGAAAG TACTTGTCTG GAAACGGGCT GCGGAAATAG GACGTCGCC -3'</p>
18	Selenomonas lacticifex	DSM 23S-spacer-5S Operon 2 20757	<p>5' - AAGTGTCTGAA AGCATCTAAG CGTGAAGCC GTCCCCGAGAT GAAGTATCTC 50</p> <p>ATGGGAGTAAT CCAGTAAGAT TCCTTGAAAGA AGACAAGGTA GATAGGTTGG 100</p> <p>GAGTGTAAAGC ATCGTAAGGT GTTCAGCGGA CCAATACTAA TAAATCGAGG 150</p> <p>GCTTATCTTA ATAATCTAGA ATGTTTCGAT ACAATTTC TTCTGTATAA 200</p> <p>TTTGTAGTGG ACATGGTCA TTCAATAATAA TCCAGTGACG ATAGCTGAGT 250</p> <p>GGTACCACT GTTCCATAC CGAACACAGT AGTTAAGCAC TCAATACGCC 300</p> <p>AAAGTACTTG TCTGGAAACG GGCTGGAAA ATAGGACGCC GCC -3'</p>
19	Zymophilus raffinosivorans	DSM 23S-spacer-5S 20765	<p>5' - AAGTGTCTGAA AGCATCTAAG CGTGAACCA GCCTTGAAAGA AGACAAGGTA GATAGGTTCTC 50</p> <p>ACAGAGCAAT CTGGTAAGAC CCGTGGAAAGC GCACTTAAGT GTGCCAGCGGA CGGATACTAA TAGGTGAGG 100</p> <p>GAGTGGAAAGC GCAGTAATGT GCTTGACTTA AAGCCZGAAAC GAAAACTAA ATGCAACAT TTCTTCTCTC 150</p> <p>TGTATAGTT TGAGAGAAACA AACTCTTAAG ATGGAGTAGT CTGAGGGCAA 200</p> <p>AGGGAAAGGC AGCGATATCT AAAAAAAGAA TATCTGGTAG TGATAGCCAA 250</p> <p>GTGGACCCAC CTGTTCCCAT ACGAAACACA GTAGTTAAGC ACTTGAACGT 300</p> <p>CGAAAGTACT TGGTCTGAAA CGCCCTGCGA AAATAGGACA CGGCC -3'</p>

SEQ ID NO	Herkunft		Beschreibung	Sequenz
20	Zymophilus paucivorans	DSM 20759	23S-spacer-5S	<p>5' - AAGTGCTGAA AGCATCTAAG CGTGAACCA GCCTTAAGAT GAGGTTCCTC 50</p> <p>ACAGAGCAA CTGGTAGAC CCCTTGAAA AGACAAGGTAA GATAAGTCGGG 100</p> <p>GAGTGGAAAGC GCAGTAAATGT GTGTAGCGGA CCGATACTAA TAGTCGAGG 150</p> <p>GCCTTGACTTA AGGCCAGAAC GAATTCTAA ATGCGAACAT TTCTTTCTTC 200</p> <p>TGTATAGTT TGAGAGAACAA GACTCTTAAG ATGAGCAGTC TGAGGCAGAA 250</p> <p>GCTAAAGGA GCGATATCTA AAAAAGAA TATCTGGTAG TGATAGCCAA 300</p> <p>GTGGACCCAC CTGTTCCAT ACCGAAACACA GTAGTTAACGC ACTTGAACGT 350</p> <p>CGAAAGTACT TGGGTTGGAAA CGCCCTGGGA AAATAGGACA CGGCC-3'</p>

Tabelle 2

SEQ ID NO	Beschreibung		Sequenz
21	<i>Lactobacillus brevis</i>	Spezifische Sonde	5' - CCAAGTCACAAACGTAGTGTG
22	<i>Lactobacillus lindneri</i>	Spezifische Sonde	5' - GACACAGGGTTAARTCRAAGTGT
23	<i>Lactobacillus casei</i>		-3'
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Spezifische Sonde	-3'
24	<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp. <i>coryniformis</i>	Spezifische Sonde	AGGTTTCTGCGACTGCGAAC
	<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp. <i>torquens</i>		-3'
25	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Spezifische Sonde	ATGTACGTAGTGTAGTTAACGGGC
26	<i>Pediococcus damnosus</i>	Spezifische Sonde	-3'
27	<i>Pediococcus inopinatus</i>	Spezifische Sonde	CTTCTCAGTGGCAAGCACAA
28	<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	Spezifische Sonde	GTTCTCAAGGAAGGGATTCG
29	<i>Pectinatus frisingensis</i>	Spezifische Sonde	GTTCCTCAAAGAGAAAGATTTCGATATTA
30	<i>Pectinatus</i> sp. DSM 20764	Spezifische Sonde	TGAGAGCGTAAACACTGGGACTTT
31	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	Spezifische Sonde	CAGATAAGTTCTGGTTACG
32	<i>Selenomonas lacticifex</i>	Spezifische Sonde	CACTAAGGGCAGAAAAGAACGTT
33	<i>Zymophilus raffinosivorans</i>	Spezifische Sonde	CTTTTCGATCTAGTTGTCAGGATAACG
34	<i>Zymophilus paucivorans</i>	Spezifische Sonde	GTTCATCATCAATAATATCCAGTGACG
35	<i>Pediococcus</i> Genus	Genusspezifische Sonde	-3'
			AACTCTTAAGATGGAGYAGTCTG
36	<i>Pectinatus</i> Genus	Genusspezifische Sonde	-3'
			ACTCTTAAGATGGCAGTCGTA
			-3'
			AGTSTAGTGTACATGGAGCG
37	<i>Megasphaera</i> Genus	Genusspezifische Sonde	-3'
38	<i>Selenomonas</i> Genus	Genusspezifische Sonde	GACCGAGGACTTGACTTAAGCA
39	<i>Zymophilus</i> Genus	Genusspezifische Sonde	-3'
			TCCAGTGACGATAGCTGAGT
			-3'
			AAGAAATACTGGTAGTGTATAAGCCAA
			-3'

Tabelle 2 (Forts.)

SEQ ID NO	Beschreibung	Sequenz
40	Consensus - Sequenz	5'-- GTCTGTGAGACAGCTTCGGTC
41	Consensus - Sequenz	5'-- CYTAGTACCGAGGACCGGRR
42	Consensus - Sequenz	5'-- GCTACCCCTGGGGATAAACAGGC
43	Consensus - Sequenz	5'-- ATGCACGGGGAGGTTTSSCAC
44	Consensus - Sequenz	5'-- CACCTTCGATGTCGGCTCRTC
45	Consensus - Sequenz	5'-- CCAAGGGTTGGGCTGTTC
46	Consensus - Sequenz	5'-- AAGGGGCCATCRCTCAACGG
47	Consensus - Sequenz	5'-- AAGTGCTGAAAGCATCTAAG
48	Consensus - Sequenz	5'-- TGTGTTCGIIATGGGAACAGGTC
49	Consensus - Sequenz	5'-- TGTGTTCCGAATGGGAACAGGTC
50	Consensus - Sequenz	5'-- TGTGTTCGAAAATGGGAACAGGTC
51	Consensus - Sequenz	5'-- TGTGTTCCGAATGGGAACAGGTC
52	Consensus - Sequenz	5'-- TGTGTTCCGAATGGGAACAGGTC
53	Consensus - Sequenz	5'-- TGTGTTCCGAATGGGAACAGGTC
54	Consensus - Sequenz	5'-- TGTGTTCCGAATGGGAACAGGTC
55	Consensus - Sequenz	5'-- GGCRRYGTCCATGGGAACAGGTC
56	Consensus - Sequenz	5'-- GGCAGTGTCCATACTTTCCC
57	Consensus - Sequenz	5'-- GGCAGGCTCCATACTTTCCC
58	Consensus - Sequenz	5'-- GGCAGTGTCCATACTTTCCC
59	Consensus - Sequenz	5'-- GGCAGCGTCCTACATTTCGC
60	Consensus - Sequenz	5'-- GYTINMRCTTCYRDGTTCG
61	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTCCGTTGTTCG
62	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTCTATGTTGCG
63	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTTCATGTTGCG
64	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTCCATGTTGCG
65	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTCCGGGTTGCG
66	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTCTAGGTTGCG
67	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTCTGGGTTGCG
68	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTCCAGGTTGCG
69	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTCCGGAGTTGCG
70	Consensus - Sequenz	5'-- GCTTAACCTCTAAGTTGCG

Tabelle 2 (Forts.)

SEQ ID NO		Beschreibung		Sequenz
71	Consensus - Sequenz		5`-	GCTTAAC TCTGAGTTTG
72	Consensus - Sequenz		5`-	GCTTAAC TCCAAGTTG
73	Lactobacillus brevis	spezifische Sonde	5`-	TCGAGAAATAATTGAAATAATCTAG
74	Lactobacillus brevis	spezifische Sonde	5`-	GAGGGAAAGAAGGTCTCTTAT
75	Lactobacillus lindneri	spezifische Sonde	5`-	AACAGAGAAAGATAATTCTAGTT
76	Lactobacillus lindneri	spezifische Sonde	5`-	TTGAGAGAACCGAAGTTGCTCAGGCTTATGAAAATAAGCAT
77	Lactobacillus casei	spezifische Sonde	5`-	TTCGTTTCGATGAAATAACTGGTTCGGCAACACACAAAAAACAAACATG
78	Lactobacillus casei	spezifische Sonde	5`-	GCCTTTAGCCAGTAAACATGAGCCAGTTATGGTTCTTATGTGG
79	Lactobacillus casei paracasei	spezifische Sonde	5`-	ATAGCCAGTTAGCCAGTT
80	Lactobacillus paracasei	spezifische Sonde	5`-	TTAGAAANACGGGACAATAAGGGGGCTGAG
81	Lactobacillus paracasei	spezifische Sonde	5`-	GCGTGATGCCGGCTTTGGCCATTGCGGTCAGGGTCTCTAGTC
82	Lactobacillus coryniformis	spezifische Sonde	5`-	CAAGTACGTTAAGTTCAGGCAGCAATTAAACATGATAGCTAGTT
83	Lactobacillus curvatus	spezifische Sonde	5`-	AAAGAAATTGAATAATCCAGTTGAGAGCGAACGTTCTAGAAA
84	Pediococcus damnosus	spezifische Sonde	5`-	AGGTGCAATGTTAGGCCTTTGAAATGAAATTTACTTATTATGCAGTT
85	Pediococcus inopinatus	spezifische Sonde	5`-	GCCCCGTAAGTGGATCGGAGAA
86	Pediococcus damnosus	spezifische Sonde	5`-	GCGCGGAAGTGGATCGGAGAA
	Pediococcus inopinatus	spezifische Sonde	5`-	GAGAGAAATAATTCTCTTACACAGA
	Pediococcus parvulus	spezifische Sonde	5`-	-3`-
87	Pectinatus cerevisiiphilus	spezifische Sonde	5`-	AAAATCATCGAAAAAATGTTGGTCTGAGATTCTCT
88	Pectinatus cerevisiiphilus	spezifische Sonde	5`-	CACTCTGGTTGAAGGGCAGGGAAGC
89	Pectinatus frisingensis	spezifische Sonde	5`-	GATTTCATCAA AAAAGAGAAATGTTGGTCAGAGATTT
90	Pectinatus frisingensis	spezifische Sonde	5`-	TATATACCGGCTGAGGTGCTGAGGC ACTGAGG
91	Pectinatus sp. DSM 20764	spezifische Sonde	5`-	ATTTCATCTATAAATGTTGGTCTCGATTTCTCT
92	Pectinatus sp. DSM 20764	spezifische Sonde	5`-	AGATTAGTTCTGGTTACTTTATATGAGCACTAAGGTCAGAAA
93	Pectinatus sp. DSM 20764	spezifische Sonde	5`-	GAACGT AGGAAACGGGGGTTCCGAA
94	Selenomonas lacticifex	spezifische Sonde	5`-	TTATAATCTAGAATGTTCTGATACAAATTCTCTGTATAGTTGAA
				GTGGACAT
95	Zymophilus raffinosivorans	spezifische Sonde	5`-	GAGGGAAAGGGAAAGGCAGGCAGT
96	Zymophilus paucivorans	spezifische Sonde	5`-	GAGGGAAAGGCTAAAGGCAGGCAGT
97	Megasphaera cerevisiae	spezifische Sonde	5`-	ATT CCTGAAACGAAATTCA GTGGTGTATGGCTGCAGGGAA

Tabelle 2 (Forts.)

SEQ ID NO	Beschreibung	Sequenz
98		5' - TATGGAAGTAAAGACCCCTGA -3'
99		5' - AGATGATCAGTCAGTAGATAGGCT -3'
100	Nachweis aller bierrelevanten <i>Lactobacillaceae</i> zur Differenzierung von anderen brauereirelevanten Bakterien	5' - AGATGATCAGGTGCGATAGGTT -3'
101		5' - AGATGATCAGGTAGATAGGTT -3'
102		5' - TACTAATCGGTGAGGACTTAACCA -3'
103		5' - ATACTAATTCAGTCAGGACTTAACCA -3'
104	Pectinatus Genus	5' - GAAGGGGACTGCTACTATAAGCCGGAGGCTT -3'
105	Selenomonas Genus	Genusspezifische Sonde 5' - CAGGGGACCAAATACTAATAANTCGAGGGCTTA -3'
106	Zymophilus Genus	Genusspezifische Sonde 5' - AGGGGACCGATACTAAATAGGTGAGGGCTTGACTTAAA -3'
107	Megasphaera Genus	Genusspezifische Sonde 5' - GGAGGGACCGGTACTAAATAGACCGAGGACTT -3'

Tabelle 3

29

	SEQ ID NO 33	SEQ ID NO 34	SEQ ID NO 35	SEQ ID NO 36	SEQ ID NO 37	SEQ ID NO 38	SEQ ID NO 39	SEQ ID NO 40-45
<i>actobacillus brevis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>actobacillus lindneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>actobacillus casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>actobacillus paracasei</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>actobacillus coryniformis coryniformis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>actobacillus coryniformis torquens</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>actobacillus curvatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>ediococcus damnosus</i>	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>ediococcus opinatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>ectinatus cerevisiiphilus</i>	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>ectinatus frisingensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>ectinatus sp. DSM 20462</i>	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>legasphaera cerevisiae</i>	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>elenomonas lacticifex</i>	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>ymophilus raffinosivorans</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>ymophilus paucivorans</i>	-	+	-	-	-	-	-	+

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von brauereirelevanten Mikroorganismen in einer Probe, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Inkontaktbringen der Probe mit einer Kombination aus mindestens zwei ersten Nukleinsäuremolekülen (Primern), die mit einem in brauereirelevanten Mikroorganismen konservierten Bereich einer mikrobiellen Nukleinsäure hybridisieren;
 - (b) Amplifizieren der mikrobiellen Nukleinsäure oder eines Teils derselben zur Erzeugung von mindestens einem Amplifikationsfragment;
 - (c) Inkontaktbringen der in Schritt (b) erhaltenen Amplifikationsfragmente mit mindestens einem zweiten Nukleinsäuremolekül (Sonde), welches mit mindestens einem Amplifikationsfragment spezifisch hybridisiert, das eine für sämtliche brauereirelevanten Mikroorganismen oder für eine oder mehrere Familien, Gattungen oder Arten von brauereirelevanten Mikroorganismen spezifische Sequenz der mikrobiellen Nukleinsäure umfaßt;
 - (d) Nachweis von mindestens einer Hybridnukleinsäure, die aus einem Amplifikationsfragment und einem im Schritt (c) eingebrachten zweiten Nukleinsäuremolekül besteht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifizieren eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) umfaßt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifizieren eine Ligasen-Kettenreaktion umfaßt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifizieren eine isotherme Nukleinsäureamplifikation umfaßt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Nukleinsäuremolekül zur Erzeugung eines nachweisbaren Signals modifiziert bzw. markiert ist, wobei die Modifikation bzw. Markierung ausgewählt wird aus
 - (i) radioaktiven Gruppen
 - (ii) farbigen Gruppen,
 - (iii) fluoreszierenden Gruppen,
 - (iv) Gruppen zur Immobilisierung an einer festen Phase und
 - (v) Gruppen, die eine indirekte oder direkte Reaktion, insbesondere mit Hilfe von Antikörpern, Antigenen, Enzymen und/oder Substanzen mit Affinität zu Enzymen oder Enzymkomplexen erlauben.
6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ersten Nukleinsäuremoleküle und/oder das zweite Nukleinsäuremolekül mindestens 10 Nukleotide, vorzugsweise 15-30 Nukleotide lang sind.
7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die ersten Nukleinsäuremoleküle und/oder das zweite Nukleinsäuremolekül dadurch modifiziert sind, daß bis zu 20% der Nukleotide in 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide aus dem 10er-Block durch Nukleotide ersetzt sind, die in Bakterien nicht natürlich vorkommen.
8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der konservierte Bereich in dem Genomabschnitt vorkommt, der die bakteriellen 23 S- und 5 S-Gene enthält.
9. Nukleinsäuremolekül als Sonde und/oder Primer zum Nachweis von brauereirelevanten Mikroorganismen, ausgewählt aus:
 - (i) einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 1-107 oder ein mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotide langes Fragment derselben;
 - (ii) einer Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure nach (i) spezifisch hybridisiert;
 - (iii) einer Nukleinsäure, die mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 90% identisch mit einer Nukleinsäure nach (i) oder (ii) ist, oder
 - (iv) einer Nukleinsäure, die komplementär zu einer Nukleinsäure nach (i) bis (iii) ist.

10. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es eine DNA oder eine RNA ist.
11. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es eine PNA ist.
12. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß bis zu 20% der Nukleotide in 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, insbesondere 1 oder 2 Nukleotide aus dem 10er-Block durch Nukleotide ersetzt sind, die in Bakterien nicht natürlich vorkommen.
13. Kombination aus mindestens zwei Nukleinsäuremolekülen, ausgewählt aus:
 - (1) einer Kombination aus mindestens zwei Nukleinsäuremolekülen nach einem der Ansprüche 9 bis 12, und
 - (2) einer Kombination, die mindestens ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 40 bis 47 und mindestens ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 48-54 oder SEQ ID NO 55-59 oder SEQ ID NO 60-72 umfaßt.
14. Kit, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 9 bis 12 und/oder eine Kombination nach Anspruch 13.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt (a) eine Kombination aus mindestens zwei Nukleinsäuremolekülen nach Anspruch 13 eingesetzt wird.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß als zweites Nukleinsäuremolekül (Sonde) mindestens ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 9 bis 12 eingesetzt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß als zweites Nukleinsäuremolekül (Sonde) mindestens ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 35 bis 39 oder 98-107 eingesetzt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß als zweites oder weiteres Nukleinsäuremolekül (Sonde) mindestens ein Nukleinsäuremolekül mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 21 bis 34 oder SEQ ID NO 73-97 eingesetzt wird.
19. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 9 bis 12 und/oder einer Kombination nach Anspruch 13 zum Nachweis von brauereirelevanten Bakterien.
20. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 9 bis 12 zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von brauereirelevanten Bakterien.
21. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 35 oder SEQ ID NO 86 zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Gattung *Pediococcus*.
22. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 36 oder SEQ ID NO 104 zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Gattung *Pectinatus*.
23. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 37 oder SEQ ID NO 107 zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Gattung *Megasphaera*.
24. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 38 oder SEQ ID NO 105 zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Gattung *Selenomonas*.

25. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 39 oder SEQ ID NO 106 zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Gattung *Zymophilus*.
26. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 21 oder SEQ ID NO 73-74 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Lactobacillus brevis*.
27. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 22 oder SEQ ID NO 75-76 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Lactobacillus lindneri*.
28. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 23 oder SEQ ID NO 77-79 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Lactobacillus casei*.
29. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 23 oder SEQ ID NO 79-81 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*.
30. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 24 oder SEQ ID NO 82 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformis*.
31. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 24 oder SEQ ID NO 82 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder

Charakterisieren von Bakterien der Art *Lactobacillus coryniformis* ssp. *torquens*.

32. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 25 oder SEQ ID NO 83 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Arten *Lactobacillus curvatus*.

33. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 84 oder SEQ ID NO 86 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Pediococcus damnosus*.

34. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 27, SEQ ID NO 85 oder SEQ ID NO 86 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Pediococcus inopinatus*.

35. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 28 oder SEQ ID NO 87-88 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Pectinatus cerevisiiphilus*.

36. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 29 oder SEQ ID NO 89-90 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Pectinatus frisingensis*.

37. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 30 oder SEQ ID NO 91-93 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien des Stammes *Pectinatus* sp.

DSM20764.

38. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 31 oder SEQ ID NO 97 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Megasphaera cerevisiae*.
39. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 32 oder SEQ ID NO 94 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Selenomonas lacticifex*.
40. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 19, SEQ ID NO 33 oder SEQ ID NO 95 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Art *Zymophilus rafinosivorans*.
41. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer Sequenz nach SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 34 oder SEQ ID NO 96 oder eines Fragments desselben mit mindestens 10, vorzugsweise 15-30 Nukleotiden zum Nachweis und/oder zum Identifizieren und/oder Charakterisieren von Bakterien der Arten Art *Zymophilus paucivorans*.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BioteCon Diagnostics GmbH

<120> Verfahren und Nukleinsäuren zum Nachweis von
brauereirelevanten Mikroorganismen

<130> PCT1218-066

<140>
<141>

<160> 107

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 267

<212> DNA

<213> Lactobacillus brevis

<400> 1

tatatggaaag taagaccctt gagagatgt caggttagata ggctgaaagt agcagcgccg 60
tgaggcggtgg agcgaccagg tactaatcggt tcgaggactt aaccaagtca acaacgttagt 120
tgtttcgaga ataattgaat aatatcttagt tttgaggaa gaagttctct tatagtgtgg 180
tggcgatagc ctgaaggata cacctgttcc catgcccgaac acagaagtta agcttcagca 240
cgccgatagt agttgggggat tcgcccc 267

<210> 2

<211> 326

<212> DNA

<213> Lactobacillus lindneri

<400> 2

ccatttcctat atggaagtaa gactcctgaa agatgatcag gtcgataggt tagaagtgg 60
agcatatgtat tatgtgaagc ggactaatac taatcagtgc aggacttaac caaggaagac 120
acagggttaa atcaaagttg aacagagaag atattatcta gttttgagag aacgaagttc 180
gctcaggctt atgaaaaata agcatatgtt ggtggcgata gcctgaagga tacacctgtt 240
cccatgccga acacagaagt taagtttcag cacgccaaaa gtagttgggg gatcgcccc 300
tgcgaggata ggacgatggat catagc 326

<210> 3

<211> 351

<212> DNA

<213> Lactobacillus casei

<400> 3

ccatttcctat atggaagtaa gaccctgtgg agatgatcag gtagatagggc tggaagtgg 60
agtgcagcga tgcattggggc ggaccgtac taatcggtcg aggacttaac caagtagagc 120
gtgagcgggaa ggccttagaa accggagcat aagcggggct gagttcggtt gcccgggttt 180
ggccaatggg ttcagggttc ttatgtggag gtttctgcga ctgcgaacgc gtttcgatga 240
aatacactgg ttcccgacaa cacaacaaaca acaatgatag ccagttttga gagcgcaaag 300
ttctcataag tgtggtggcg atagcaagaa ggatacacct gttcccatgc c 351

<210> 4
<211> 414
<212> DNA
<213> Lactobacillus paracasei

<400> 4
ccattcctat atggaagtaa gaccctgag agatgatcg gtagataggc tggaaagtgg 60
agtgcagcga tgcattggagc ggaccagttac taatcggtcg aggacttaac caagtaagag 120
tgtgagcagg agcgggtttaga aaccggagca taagcgggccc tgagcgtgat ggccgggctt 180
tggccatttc ggtcagggtc cttatgtgca ggtttctgctg actgcgaaca cgtttcgatg 240
acaagtaegt taagttcaag gcagcaatta aacaatgata gctagtttg agagcgcaaa 300
gttctcataa gtgtgggtggc gatagcaaga aggatacacc tgttccatg ccgaacacag 360
aagtttaagct tcttcacgccc gagagtagtt ggtgggaaac tgcctgcgag gata 414

<210> 5
<211> 338
<212> DNA
<213> Lactobacillus paracasei

<400> 5
ccattcctat atggaagtaa gaccctgag agatgatcg gtagataggc tggaaagtgg 60
agtgcagcga tgcattggagc ggaccagttac taatcggtcg aggacttaac caagtaagcg 120
tgcaaggcagg agcagggttcc tgcaactgctg aacacatttc gatgacaagt acgttaagtt 180
caaggcagca attaaacgat gatagccagt tttgagagcg caaagttctc ataagtgtgg 240
tggcgatagc aagaaggata cacctgttcc catgccgaac acagaagttt agtttcttca 300
cgccgagagt agttgggtggg aaactgcctg cgaggata 338

<210> 6
<211> 317
<212> DNA
<213> Lactobacillus coryniformis ssp. coryniformis

<400> 6
ctcgagttga gatttccat tcctttatgg aagtaagacc cctgagagat gatcaggtag 60
atagggttggaa agtggacgtg ccgtgaggca tggagcggac caatactaatt cggtcgaggg 120
cttaaccaag tagcatgtac gtagtggtag tttaaggggca aagaaatgaa tatccagttt 180
tgagagcgca acgttctcag aaagtgggtgt ggtggcgata gcaagaagga tacacctgtt 240
cccatgtcga acacagaagt taagcttctt agcgccgaga gtagttgggg gagcaccccc 300
tgcgaggata ggacgat 317

<210> 7
<211> 317
<212> DNA
<213> Lactobacillus coryniformis ssp. torquens

<400> 7
ctcgagatga gatttccat tcctttatgg aagtaagacc cctgagagat gatcaggtag 60
atagggttggaa agtggacgtg ccgtgaggca tggagcggac caatactaatt cggtcgaggg 120
cttaaccaag tagcatgtac gtagtggtag tttaaggggca aagaaatgaa tatccagttt 180
tgagagcgca acgttctcag aaagtgggtgt ggtggcgata gcaagaagga tacacctgtt 240
cccatgtcga acacagaagt taagcttctt agcgccgaga gtagttgggg gagcaccccc 300
tgcgaggata ggacgat 317

<210> 8
<211> 336
<212> DNA
<213> Lactobacillus curvatus

<400> 8
acgcctcgag atgagattc ccattcctt atggaagtaa gaccctgaa agatgatcag 60
gtagataggc taggagtggaa agtacagcga tgtatggagc ggactagtac taatcggtcg 120
aggacttaac caaagggtca atgttaggct tttgaaatga aatattactt attatgcagt 180
tttgagagaa cgaagttctt ctcaagtgcgc aagcacaaaa tagtgtggtg gcgatagcaa 240
gaaggataca cctgttccca tgtcgaacac agaagttaaag cttcttagcg ccgatagtag 300
tttgtggaa actacctgcg aggataggac gatggt 336

<210> 9
<211> 335
<212> DNA
<213> Pediococcus damnosus

<400> 9
gatgagattt cccattccat ttatggaagt aagacccctg agagatgatc aggttagatag 60
gttggggagt gaaatgttagt gatacatgg gcccggccaa actaatcggt cgaggactta 120
accacaaaat ggtgttctca agagaaggat tcgatattat ttagtttga gagaataaaat 180
ttctttcaca cgagccgcgt aagtggatcg gagaagtgtg gtgacgatag tgagaaggat 240
acacctgttc ccatgtcga cacagaagtt aagcttctt acgcccggag tagttgggg 300
atcgctccct gcgaggatag gacgatggtc aataag 335

<210> 10
<211> 326
<212> DNA
<213> Pediococcus inopinatus

<400> 10
agatgagattt tcccattcca tttatggaag taagacccct gagagatgat caggtagata 60
ggttggggagt ggaatgttagt tgatacatgg agcggccaa tactaatcggt tcgaggactt 120
aaccacaaaat tggtgttctca aaagagaaga tttcgatattt attttagttt gagagaataaa 180
atttcttca cacgagccgc ggaatggat cgagaatgtg tggtgacgat agtgagaagg 240
atcacacctgt tcccattgtcg aacacagaag ttaagcttctt taacgcccggag agtagttggg 300
ggatcgctcc ctgcgaggat aggacg 326

<210> 11
<211> 403
<212> DNA
<213> Pectinatus cerevisiiphilus

<400> 11
aagtgctgaa agcatctaag cgtgaaaacct gccttaagat gaggtttccc agagccgtaa 60
ggcttggaaag gcacattgaa taagacgagg tagataggcc gggagtagaa gtacagtaat 120
gtacgaagcg gactggtaact aataagccga gagcttaact taaaatcatc gaaaaaaaaatg 180
tttggtctga gatttcttctt gtgaagttt gagtgtgcga gacactctgg ttgaaggcga 240
gggaacgtga gagcgtaaaaa ctgcggactt tgctcaaaag agttaaagca tctggtgacg 300
atacctggat ggatccacct gttccccattc cgaacacagt agttaagcat ccacaggctg 360
aaggtaacttgc gggggcgacc ccctggaaaa ataggacact gcc 403

<210> 12
<211> 434
<212> DNA
<213> Pectinatus frisingensis

<400> 12
aagtgctgaa agcatctaag cgtgaaaacca gccttaagat gaggttccc agaacgcaag 60
tttggaaaggc accttgaaga agacgaggta gataggccgg gagtggaaagt atggtgacat 120
atgaagcgaa ctggtaactaa taagccgaga gccttaacttg atttcataa aaaagagaaa 180
tggttggtca gagattttct tctgtgaagt tttagtgtg caagaacact cgagagtata 240
taggtaaagg aaaagcagca gataagttc ctggtaactg tatataccgg ctgagggtgct 300
gagggactga aggccagaac atctggtggc gatacctgga tggatccacc tgttcccatt 360
ccgaacacag tagttaagca tccacaggcc gaaggtactt gggggcagc cccctgcgaa 420
aataggacac cgcc 434

<210> 13
<211> 641
<212> DNA
<213> Pectinatus spec. DSM20764

<400> 13
aagtgctgaa agcatctaag cgtgaaaacct gccttaagat gaggttccc agagccgtaa 60
ggcttggaaag gcaccttcaa gatgacgagg tagataggcc gggagtagaa gtatggtgac 120
atacgaagcg gactggtaact aataagccga gagcttaact taatttcatac tataaatgtt 180
tggcctgtat ttcttctgtg aagtttgag tggcaagat cactcatgaa agtataatagg 240
taaaggggaaa gcagcagatt agttcctggt ttactttata tatgagcact aaggtgcaga 300
aaagaacgtt tgaggaaacg cggcggtcgt aaactcaatt tgcgtgctga ttatctcaat 360
gctaaagcat taagataatt ttagaggaaa cgcgcgttca ctgcgttca ctctgcgtac 420
tttatttcata agtgcgtgaa cactaagaag gcaaggaaa cgcgtgttc gcgatgctca 480
cttgcgtac ttcatctca gactgctaaa gcagtaagat ctgaagcatt tggtggcgat 540
acctggatgg atccacactgt tcccatccg aacacagtag ttaagcatcc acaggccgaa 600
ggtaacttggg gggcagcccc ctgcgagactt aggacatcgc c 641

<210> 14
<211> 495
<212> DNA
<213> Pectinatus spec. DSM20764

<400> 14
aagtgctgaa agcatctaag cgtgaaaacct gccttaagat gaggttccc agagccgtaa 60
ggcttggaaag gcaccttcaa gatgacgagg tagataggcc gggagtagaa gtatggtgac 120
atacgaagcg gactggtaact aataagccga gagcttaact taatttcatac tataaatgtt 180
tggcctgtat ttcttctgtg aagtttgag tggcaagat cactcatgaa agtataatagg 240
taaaggggaaa gcagattgt tcctgggtaa ctttatataat gagcactaag gtgcagaaaa 300
gaacgtctaa ggaaacgcgg cggtcgtagg ctcaactctgc gtacttcatac tctagactgc 360
taaagcagta agatctgaag catctggtgg cgatacctgg atggatccac ctgttcccatt 420
tccgaacaca gtatgttca agtgcgtgaa cactaagaag gcaaggaaa cgcgtgttc gcgatgctca 480
aagttaggaca ccgccc 495

<210> 15
<211> 546
<212> DNA
<213> Megasphaera cerevisiae

```
<210> 16
<211> 306
<212> DNA
<213> Megasphaera cerevisiae
```

```
<400> 16
gcatctaacc gtgaaaccag cctagagatg aggtttctca ttacgaaagt aagtaaggc 60
ccatgaagac gacatggtag ataggccggg agtggacgta cagtaatgta tggagccggac 120
cggtactaat agaccgagga cttgacttaa gcaaagaagc aatagaaaaga accatgtaga 180
tggtgtaaga gttagacggg tagttaaggt ccgaaatact tttcgatgta gttgtcagga 240
tacgaatcct gaaacgaatt cagtggtgat ggctgcaggg accacacctt cccataccga 300
acacag 306
```

<210> 17
<211> 449
<212> DNA
<213> *Selenomonas lacticifex*

```
<400> 17  
aagtgcgtaa agcatctagg cgtgaaggct gtccccgagat gaagtatctc atggagtaat 60  
ccagtaagat tccttgaaga agacaaggta gatagggttgg gagtgtaagc atcgtaaggt 120  
gttcagcggc ccaatactaa taaatcgagg gcttaacttt acagacctgt ccaagaagcg 180  
aagcggattg ggtaacaggt cgtatgcgaa aacatcccaa gaatcgagtc cgaaggcg 240  
agatgattgg cagatgttga ccgctataaa tctagaatgt ttgcatacaa tttttcttct 300  
gtatagtttt gagtgacat cgttcattca ataatatcca gtgacgatag ctgagtggt 360  
ccacctgttc ccataaccgaa cacagtagtt aagcactcat acgcccggaaag tacttgtctg 420  
qaaacqqqqct qcqqaataq qacggtcqcc 449
```

<210> 18
<211> 343
<212> DNA
<213> *Selenomonas lacticifex*

```
<400> 18  
aagtgcgtaa agcatctaag cgtgaaggct gtcccgagat gaagtatctc atggagtaat 60  
ccagtaagat tccttgaaga agacaaggta gatagggtgg gagtgtaagc atcgtaaggt 120  
gttcagcggc ccaataactaa taaatcgagg gcttatctta ataatctaga atgtttcgat 180  
acaatttttc ttctgtatag ttttgagtgg acatggttca ttcaataata tccagtgacg 240  
atagctgagt ggtaccacct gttcccatac cgaacacagt agttaaggcac tcatacgccg 300  
aaaqtacttq tctqqaaacq qqctqcqaaa ataqqacqccc qcc 343
```

<210> 19
<211> 395
<212> DNA
<213> Zymophilus raffinosivorans

<400> 19
aagtgctgaa agcatctaag cgtgaaacca gccttaagat gaggttctc acagagcaat 60
ctggtaagac cccttgaaga agacaaggta gatacggtcg gagtggaaac gcagtaatgt 120
gtgcagcgg a cggataactaa taggtcgagg gcttgactta aagccagaac gaaaactaaa 180
atgcgaacat ttctttcttc tgtatagtt tgagagaaca aactcttaag atggagtagt 240
ctgagggcgaa agcggaaaggc agcgatatct aaaaaaaagaa tatctggtag tgatagccaa 300
gtggaccac ctgttcccat accgaacaca gtatggaaac acttgaacgt cgaaagtact 360
tgggtggaaa cgccctgcga aaataggaca ccgcc 395

<210> 20
<211> 395
<212> DNA
<213> Zymophilus paucivorans

<400> 20
aagtgctgaa agcatctaag cgtgaaacca gccttaagat gaggttctc acagagcaat 60
ctggtaagac cccttgaaga agacaaggta gatacggtcg gagtggaaac gcagtaatgt 120
gtgtagcgg a cggataactaa taggtcgagg gcttgactta aagccagaac gaattctaaa 180
atgcgaacat ttctttcttc tgtatagtt tgagagaaca gactcttaag atgagcagtc 240
tgaggcggaaa gctaaaggca gcgatatcta aaaaaaaagaa tatctggtag tgatagccaa 300
gtggaccac ctgttcccat accgaacaca gtatggaaac acttgaacgt cgaaagtact 360
tgggtggaaa cgccctggga aaataggaca ccgcc 395

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
Sequenz für Lactobacillus brevis

<400> 21
ccaagtcaac aacgttagtt t

21

<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
Sequenz für Lactobacillus lindneri

<400> 22
gacacaggggt taaaatcaaag ttg

23

<210> 23

<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus casei und Lactobacillus paracasei

<400> 23
aggtttctgc gactgcgaac 20

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus coryniformis

<400> 24
atgtacgtag tgttagttta agggc 25

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus curvatus

<400> 25
cttctcagtg cgcaaggaca 20

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pediococcus damnosus

<400> 26
gtgttctcaa gagaaggatt cg 22

<210> 27
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
Sequenz für Pediococcus inopinatus

<400> 27
gttctcaaag agaagatttc gatatta

27

<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
Sequenz für Pectinatus cerevisiiphilus

<400> 28
tgagagcgta aaactgcgga ctt

23

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
Sequenz für Pectinatus frisingensis

<400> 29
cagataagg tt ccctggttac tg

22

<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
Sequenz für Pectinatus spec. DSM 20764

<400> 30
cactaagg tg cagaaaagaa cgt

23

<210> 31
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
Sequenz für Megasphaera cerevisiae

<400> 31

cttttcgatg tagttgtcag gatacg

26

<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Selenomonas lacticifex

<400> 32
gttcattcaa taatatccag tgacg

25

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Zymophilus raffinosivorans

<400> 33
aactcttaag atggagaygt ctg

23

<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Zymophilus paucivorans

<400> 34
actcttaaga tgaggcagtct ga

22

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für die Gattung Pediococcus

<400> 35
agtstagtagtga tacatggagc g

21

<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für die Gattung Pectinatus

<400> 36
gtgaagttt gagtgtaaa ga

22

<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für die Gattung Megasphaera

<400> 37
gaccgaggac ttgacttaag ca

22

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für die Gattung Selenomonas

<400> 38
tccagtgcac atagctgagt

20

<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für die Gattung Zymophilus

<400> 39
aagaatatct ggttgtata gccaa

25

<210> 40
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 40
gtcgtgagac agttcggtc

19

<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 41
cytagtacga gaggaccggr r

21

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 42
gctaccctgg ggataaacagg c

21

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 43
atcgacgggg aggtttssca c

21

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 44
cacctcgatg tcggctcrtc 20

<210> 45
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 45
ccaagggttg ggctgttc 18

<210> 46
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 46
aagggccatc rctcaacgg 19

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 47
aagtgctgaa agcatctaag 20

<210> 48
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 48
tgtgttcgii atggaaacag gtg 23

<210> 49
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 49
tgtgttcgga atggaaacag gtg

23

<210> 50
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 50
tgtgttcgaa atggaaacag gtg

23

<210> 51
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 51
tgtgttcggt atggaaacag gtg

23

<210> 52
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 52
tgtgttcgat atggaaacag gtg

23

<210> 53
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 53
tgtgttcggc atgggaacag gtg

23

<210> 54
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 54
tgtgttcgac atgggaacag gtg

23

<210> 55
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 55
ggccrrygtcc taytvtcsc

19

<210> 56
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 56
ggcagtgtcc tactttccc

19

<210> 57
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 57
ggcagcggtcc tactttcgc

19

<210> 58
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 58
ggcagtgtcc tactttcgc

19

<210> 59
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 59
ggcagcggtcc tactttccc

19

<210> 60
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 60
gyttmrcttc yrdgttcg

18

<210> 61
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 61
gcttaacttc cgtgttcg

18

<210> 62
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 62
gcttaacttc tatgttcg 18

<210> 63
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 63
gcttaacttc tgtgttcg 18

<210> 64
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 64
gcttaacttc catgttcg 18

<210> 65
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 65
gcttaacttc cgggttcg 18

<210> 66
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 66
gcttaacttc taggttcg

18

<210> 67
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 67
gcttaacttc tgggttcg

18

<210> 68
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 68
gcttaacttc caggttcg

18

<210> 69
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 69
gcttaacttc cgagttcg

18

<210> 70
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 70
gcttaacttc taagttcg 18

<210> 71
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 71
gcttaacttc tgagttcg 18

<210> 72
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Consensus-Sequenz

<400> 72
gcttaacttc caagttcg 18

<210> 73
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
Sequenz für Lactobacillus brevis

<400> 73
tcgagaataaa ttgaataata tctag 25

<210> 74
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
Sequenz für Lactobacillus brevis

<400> 74
gagggaagaa gttctttat 20

<210> 75
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus lindneri

<400> 75
aacagagaag atattatcta gtt

23

<210> 76
<211> 42
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus lindneri

<400> 76
ttgagagaac gaagttcgct caggcttatg aaaaataaagc at

42

<210> 77
<211> 45
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus casei

<400> 77
ttcggtggcc gggttttggc caatggattc agggttctta tgtgg

45

<210> 78
<211> 58
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus casei

<400> 78
gcgtttcgat gaaatacact gttcccgac aacacaaaaa caacaatgat agccagtt 58

<210> 79
<211> 29
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus casei und Lactobacillus paracasei

<400> 79

ttagaaaccg gagcataagg gggcctgag

29

<210> 80

<211> 46

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus paracasei

<400> 80

gcgtgatggc cgggcttgg ccattgcgtt cagggtcctt atgtgc

46

<210> 81

<211> 46

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus paracasei

<400> 81

caagtacgtt aagttcaagg cagcaattaa acaatgatag cttagtt

46

<210> 82

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus coryniformis

<400> 82

aaagaaaatga atatccagtt ttgagagcgc aacgttctca gaaa

44

<210> 83

<211> 48

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Lactobacillus curvatus

<400> 83
aggtgcaatg ttaggctttt gaaatgaaat attacttatt atgcagtt 48

<210> 84
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pediococcus damnosus

<400> 84
gccgcgttaag tggatcggag aa 22

<210> 85
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pediococcus inopinatus

<400> 85
gccgcggaag tggatcggag aa 22

<210> 86
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz zum Nachweis von Pediococcus damnosus, Pediococcus inopinatus und Pediococcus parvulus

<400> 86
gagagaataa atttctttca cacga 25

<210> 87
<211> 39
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pectinatus cerevisiiphilus

<400> 87
aaaatcatcg aaaaaaatgt ttggtctgag atttcttct 39

<210> 88
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pectinatus cerevisiiphilus

<400> 88
cactctggtt gaagggcagg gaacg 25

<210> 89
<211> 39
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pectinatus frisingensis

<400> 89
gatttcatca aaaaagagaa atgttggtc agagatttt 39

<210> 90
<211> 33
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pectinatus frisingensis

<400> 90
tatataccgg ctgaggtgct gaggcactga agg 33

<210> 91
<211> 36
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pectinatus spec. DSM 20764

<400> 91
aatttcatct ataaatgttt ggccctgatt tcttct 36

<210> 92
<211> 54
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pectinatus spec. DSM 20764

<400> 92

agatttagttc ctggtttact ttatatatga gcactaagg gcagaaaaga acgt

54

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Pectinatus spec. DSM 20764

<400> 93

aggaaaacgcg gcgttcgtaa

20

<210> 94

<211> 56

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Selenomonas lacticifex

<400> 94

taataaatcta gaatgtttcg atacaatttt tcttctgtat agttttgagt ggacat

56

<210> 95

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Zymophilus raffinosivorans

<400> 95

gaggcgaaag cggaaggcag cgat

24

<210> 96

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Zymophilus paucivorans

<400> 96
gaggcgaaag ctaaaggcag cgat

24

<210> 97
<211> 37
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für Megasphaera cerevisiae

<400> 97
aatcctgaaa cgaattcagt ggtgatggct gcaggga

37

<210> 98
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz zum Nachweis brauereirelevanter Bakterien der Familie der Lactobacillaceae

<400> 98
tatggaagta agaccctga

20

<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz zum Nachweis brauereirelevanter Bakterien der Familie der Lactobacillaceae

<400> 99
agatgatcag gtagataggc t

21

<210> 100
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz zum Nachweis brauereirelevanter Bakterien der Familie der Lactobacillaceae

<400> 100
agatgatcag gtcgataggt t

21

<210> 101
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz zum
Nachweis brauereirelevanter Bakterien der Familie
der Lactobacillaceae

21

```
<210> 102
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz zum
      Nachweis brauereirelevanter Bakterien der Familie
      der Lactobacillaceae

<400> 102
tactaatcgg tcgaggactt aacca
```

25

<210> 103
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz zum Nachweis brauereirelevanter Bakterien der Familie der Lactobacillaceae

<400> 103
atactaataatca gtcqaggact taaccca

26

```
<210> 104
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische
      Sequenz für die Gattung Pectinatus

<400> 104
gaagcggact ggtactaata agccgagagc tt
```

32

<210> 105
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für die Gattung Selenomonas

<400> 105
cagcgacca atactaataa atcgaggct ta 32

<210> 106
<211> 38
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für die Gattung Zymophilus

<400> 106
agcggaccga tactaatagg tcgagggtt gacttaaa 38

<210> 107
<211> 32
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: spezifische Sequenz für die Gattung Megasphaera

<400> 107
ggagcggacc ggtactaata gaccgaggac tt 32

45

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT1218-066	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/ EP 00/ 08808	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 08/09/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 24/09/1999
Anmelder		
BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

- Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 9 Blätter.
 Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.
1. **Grundlage des Berichts**
- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.
2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**
- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:
5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**
- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. —
- wie vom Anmelder vorgeschlagen
- weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.
- keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/08808

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-16, 18-20 (Teilweise) 26 (Vollständig)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 26 (vollständig)

Erfindung 1:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:1,21,73,74, oder Derivate davon und Kombinationen damit für die Bestimmung des brauereirelevanten *Lactobacillus brevis*. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

2. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 27 (vollständig)

Erfindung 2:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:2,22,75,76, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung des brauereirelevanten *Lactobacillus lindneri*. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

3. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 28,29 (vollständig)

Erfindung 3:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:3-5,23,77-81, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung der brauereirelevanten *Lactobacillus casei* und *paracasei*. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

4. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 30,31 (vollständig)

Erfindung 4:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:6,7,24,82, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung des brauereirelevanten *Lactobacillus coryniformis*. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

5. Ansprüche: 1-16,18-20 (teilweise) 32 (vollständig)

Erfindung 5:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:8,25,83, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung des brauereirelevanten *Lactobacillus curvatus*.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

6. Ansprüche: 1-17,19,20 (teilweise)

Erfindung 6:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID N0:98-103, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von alle brauereirelevanten Lactobacillaceae. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

7. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 21,33,34 (vollständig)

Erfindung 7:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID N0:9-10,26,27,35,84-86, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der Gattung Pediococcus. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

8. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 22,35-37 (vollständig)

Erfindung 8:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID N0:11,14,28-30,36,87-93,104, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der Gattung Pectinatus. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

9. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 23,38 (vollständig)

Erfindung 9:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID N0:15,16,31,37,40-72,97,107, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der Gattung Megasphaera. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

10. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 24,39 (vollständig)

Erfindung 10:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID N0:17,18,32,38,94,105, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Gattung Selenomonas. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

11. Ansprüche: 1-20 (teilweise) 25,40-41 (vollständig)

Erfindung 11:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:19,20,33,34,39,40-72,95,96,106, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von brauereirelevanten Bakterien der Gattung Zymophilus. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

12. Ansprüche: 1-16,19,20 (teilweise)

Erfindung 12:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:40-47, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von alle brauereirelevanten Bakterien. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

13. Ansprüche: 1-16,19,20 (teilweise)

Erfindung 13:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:48-54, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von alle brauereirelevanten Bakterien. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

14. Ansprüche: 1-16,19,20 (teilweise)

Erfindung 14:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:55-59, oder Derivate und Kombinationen davon für die Bestimmung von alle brauereirelevanten Bakterien. Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren benutzen oder enthalten.

15. Ansprüche: 1-16,19,20 (teilweise)

Erfindung 15:

Ein Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO:60-72, oder Derivate und Kombinationen davon für die

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bestimmung von alle brauereirelevanten Bakterien.
Anwendungen, Verfahren und Kits die diese Nukleinsäuren
benutzen oder enthalten.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

EP 00/08808

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 484 909 A (NIETUPSKI RAYMOND M ET AL) 16. Januar 1996 (1996-01-16) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-11; Beispiel 3 ---	1-8
X	SATOKARI REETTA ET AL: "Detection of beer spoilage bacteria Megasphaera and Pectinatus by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, Bd. 45, Nr. 2, 8. Dezember 1998 (1998-12-08), Seiten 119-127, XP001002138 ISSN: 0168-1605 das ganze Dokument ---	1-8 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. Mai 2001

26. 09. 2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gabriels, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

EP 00/08808

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 196 16 750 A (NEWLAB DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH) 6. November 1997 (1997-11-06) Seite 2, Zeile 24 -Seite 3, Zeile 49; Ansprüche 1-12; Beispiele 1-4 ---	1-8
X	WO 99 22023 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH ;EPPING BERND (DE); LEISER MATTHIAS (DE)) 6. Mai 1999 (1999-05-06) Seite 5, letzter Absatz; Anspruch 1; Tabelle 1 ---	1-8
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 278 (C-1065), 28. Mai 1993 (1993-05-28) & JP 05 015400 A (SAPPORO BREWERIES LTD), 26. Januar 1993 (1993-01-26) Zusammenfassung -----	1,8-16, 19,20,26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

EP 00/08808

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5484909 A	16-01-1996	EP	0674650 A	04-10-1995
		JP	8503620 T	23-04-1996
		WO	9507289 A	16-03-1995
		US	5705339 A	06-01-1998
DE 19616750 A	06-11-1997	AU	2888497 A	19-11-1997
		WO	9741253 A	06-11-1997
WO 9922023 A	06-05-1999	AU	1337099 A	17-05-1999
JP 05015400 A	26-01-1993	JP	3067850 B	24-07-2000

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

4 FEB 2002

PCT

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

714

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT1218-066	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/08808	Internationales Anmelddatum (Tag/Monat/Jahr) 08/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 24/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder BIOTECON DIAGNOSTICS GMBH		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser **BERICHT** umfasst insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht **ANLAGEN** bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsvorschriften zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt _____ Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I Grundlage des Berichts
- II Priorität
- III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 16/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 30.01.02
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter BOUTRUCHE J E E



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-30 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-42 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

19-28, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:

Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- die gesamte internationale Anmeldung.
 Ansprüche Nr. 1-16,18-20 (teilweise); 17,21-25,27-41 (vollständig).

Begründung:

- Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. 1-16,18-20 (teilweise); 17,21-25,27-41 (vollständig) wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
 Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
 - die Ansprüche eingeschränkt.
 - zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
 - erfüllt ist
 - aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
 - alle Teile.
 - die Teile, die sich auf die Ansprüche-Nr. 1-16, 18-20 (alle teilweise); 26 (vollständig) beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche-	1-8, 11-13, 15, 16, 18 (alle teilweise)
	Nein: Ansprüche	9, 10, 14, 19, 20 (alle teilweise); 26 (komplett)
Erforderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-8, 15, 16, 18 (alle teilweise)
	Nein: Ansprüche	11-13 (alle teilweise)
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche-	1-16, 18-20 (alle teilweise); 26 (komplett)
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08808

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Punkt I

Anspruch 1, der vom Anmelder am 26.07.2001 als Reaktion auf die von der Internationalen Recherchenbehörde festgestellten Nicht-Einheitlichkeit der Anmeldung eingereicht wurde, wird nicht als Änderung gemäß Artikel 19 PCT angesehen, und wird im vorliegenden Bericht nicht berücksichtigt.

Für die Prüfung der Neuheit und erfinderischen Tätigkeit wurde allerdings der Ausdruck "in brauereirelevanten Mikroorganismen" im ursprünglich eingereichten Anspruch 1, im Sinne der Beschreibung als "in allen brauereirelevanten Mikroorganismen" interpretiert.

Punkt III

Gemäß Regel 66(1)(e) PCT, können Ansprüche die sich auf Erfindungen beziehen, für die kein Internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, nicht Gegenstand einer Internationalen vorläufigen Prüfung sein. Dieser Bescheid bezieht sich daher nur auf die Ansprüche 1-16,18-20 (teilweise) und 26 (vollständig).

Punkt IV

Die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde teilt die Meinung der Internationale Recherchebehörde, die dem Anmelder mitteilte, daß die Ansprüche 1-41 insgesamt fünfzehn verschiedene Erfindungen beinhalten, die nicht durch ein gemeinsames erfinderisches Konzept verknüpft sind (Regel 13.1 PCT). Da der Anmelder daraufhin weder den Gegenstand der Ansprüche einschränkte noch zusätzliche Recherchengebühren entrichtete, beschränkte sich die Recherche auf die erste angeführte Erfindung, d.h. den Gegenstand der Ansprüche 1-16,18-20 (alle teilweise) und 26 (vollständig), die sich auf folgenden Gegenstand beziehen:

Nukleinsäuremolekül als Sonde oder Primer nach SEQ ID NO: 1,21,73,74, Derivate davon und Kombinationen daraus, für die Bestimmung von Lactobacillus

brevis, sowie Anwendungen, Verfahren und Kits unter Verwendung dieser Nukleinsäuremoleküle.

Punkt V

Folgende, im Internationalen Recherchenbericht angeführten Dokumente werden als nächster Stand der Technik angesehen:

D1: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 278 (C-1065), 28. Mai 1993 (1993-05-28) & JP 05 015400 A (SAPPORO BREWERIES LTD), 26. Januar 1993 (1993-01-26)

D2: US-A-5 484 909 (NIETUPSKI RAYMOND M ET AL) 16. Januar 1996 (1996-01-16) in der Anmeldung erwähnt

1. Ein Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem Primer verwendet werden, die "mit einem in **allen** brauereitechnischen Mikroorganismen konservierten Bereich einer mikrobiellen Nukleinsäure hybridisieren" (siehe zu diesem Ausdruck auch Punkt VIII des Bescheides), scheint im bekannten Stand der Technik weder offenbart noch nahegelegt zu sein (Artikel 33(2) und (3) PCT). Dasselbe trifft auf die abhängigen Ansprüche 2-8 und 15,16 und 18 zu.
2. D1 offenbart als Sequenz II ein 20 Nukleotide langes Fragment der Sequenz nach SEQ ID NO 1 der vorliegenden Anmeldung (Pos. 176-195). Diese Offenbarung wird als neuheitsschädlich für den Gegenstand der Ansprüche 9,10,14,19,20 und 26 erachtet (Artikel 33(2) PCT).

Angesichts der Offenbarung in D1 und in D2 (siehe Ansprüche) kann der Gegenstand der Ansprüche 11-13 als nicht erforderlich im Sinne von Artikel 33(3) PCT erachtet werden.

Punkt VIII

Der Ausdruck "brauereirelevante Mikroorganismen" (Anspruch 1) hat keine allgemein anerkannte Bedeutung und ist daher ungeeignet bestimmte

Mikroorganismen zu bezeichnen, bzw. bestimmte Arten von anderen zu unterscheiden. Dieser Ausdruck ist unklar und bewirkt daß der Anspruch nicht den Erfordernissen von Artikel 6 PCT entspricht.